



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Estructura poblacional y filogeografía de *Physalaemus fernandezae* y *P. henselii* [Amphibia-Anura]

Barrasso, Diego Andrés

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Lizarralde, Marta Susana

Co-dirección: Basso, Guillermo

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2014

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20140505001343>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Estructura poblacional y filogeografía de

Physalaemus fernandezae* y *P. henselii

(Amphibia: Anura)

Tesis presentada para obtener el título de Doctor en Ciencias Naturales

Por:

Diego Andrés Barrasso

Directores de tesis: Dra. Marta Susana Lizarralde

Dr. Néstor Guillermo Basso

La Plata, 2014

Agradecimientos

Mi interés por los anfibios comenzó hace varios años, quizá el primer contacto con estos animales fue aquel trabajo realizado en la cátedra de estadística. Desde entonces son muchas las personas que se fueron sumando y desde diferentes aspectos dieron su aporte para la realización de este trabajo. Por éste motivo resulta muy difícil no olvidarse de nadie al momento de agradecer.

Empezando por mi familia que siempre me apoyó de manera incondicional, quisiera agradecer a mis padres Antonio y Vilma, y a mi hermano Leonardo, a mis abuelos Ramón, María, Rumilda y Mario, a Héctor y Lina, y a mis primos Claudio y Andrea. Además a mis amigos Faka, Carlos, Adolfo, Leo, Gastón, Lucas, Boti, Juan Pablo, Valentín, Panchito y Papo que indirectamente o casi sin darse cuenta colaboraron dando su apoyo durante este tiempo.

A Rodrigo Cajade, Santiago Nenda y Diego Dipietro por compartir tantos buenos momentos y su invaluable ayuda durante todo el trabajo, especialmente en el trabajo de campo. A Guillermo Natale, Alicia Ronco y Gustavo Bulus que me acompañaron y ayudaron en mis comienzos dándome un lugar para mis momentos en esta disciplina. A Fernando Mapelli, Leo Conte, Samanta Cairo y Carlos Prigioni por haberme acompañado al campo y alojado en distintos viajes por Mar del Plata, Pinamar, Sierra de la Ventana y Uruguay en búsqueda de material.

Un agradecimiento muy especial para Claudio Borteiro, Francisco Kolenc y sus respectivas familias por su generosidad en mis visitas a Uruguay, por su participación activa en este estudio y por los buenos momentos compartidos en los viajes diferentes.

También quiero agradecer a Matías Baviera, Nacho Perez-Nuñez, Nacho Gould, Ariel Paracampo, Javier Negrete, Andrés Lavore, Agustín Solari, Cristian Larsen, Muriel Huchan, Agustín Scanferla, Gabriela Agostini, Gabriela Küppers, Florencia Lagos, Mili Seijas y Noelia Ferrando por haber participado de diferentes formas, durante la licenciatura y el doctorado. En especial a Gimena Dellapé por su infinita paciencia y constante apoyo.

A mis amigos y compañeros de trabajo Sebastian Poljak, Mariana Fasanella, Magali Gabrieli, Yamila Cardoso, Cecilia Bruno, Carla Layana, Natalia Esponda, Leonardo Cotichelli, Alfredo Holley, Luciano Real y Liza Martinazzo por todos los momentos y por su amistad.

A la buena predisposición de J. Williams (MLP), J. Faivovich (MACN), B. Alvares (UNNEC), L. Vega (UNMdP), R. Maneyro (ZVCB), G.M. Funk Pontes (MCT), M. Borges-Martins (UFRGS), M. Ferret Renner (MCN) y D. Arrieta (MNHN) por haber permitido el acceso a las diferentes colecciones bajo su cuidado.

Y a otra tanta gente como P. Cacivio, D. Cardozo, C. Tomatis, M. Pereyra, B. Blotto, D. Baldo, A. Giraudo, M. Ferro, F. Marangoni, P. Saibene, R. Herrera, M. Duré, E. Schaefer, L. Alcalde, F. Lobo, S. Rosset y C. Falcione que también fueron partícipes.

También quiero dar un agradecimiento muy especial a mis directores, quienes apoyaron este proyecto desde el primer momento, y a los jurados de esta tesis por sus valiosas sugerencias y correcciones.

Muchas gracias a todos!

Diego.

Índice general

Índice general	III
Resumen	VII
Abstract	IX
1. Introducción	1
1.0.1. El área de estudio	7
1.0.2. El grupo de estudio	13
<i>Physalaemus henselii</i> (Peters, 1872)	14
<i>Physalaemus fernandezae</i> (Müller, 1926)	16
Hipótesis y objetivos	22
2. Materiales y Métodos	23
2.1. Sitios de Muestreo y Distribución	23
2.1.1. Colecta y preservación de especímenes	26
2.2. Procedimientos de laboratorio	27
2.2.1. Extracción de ADN	27
2.2.2. Amplificación y secuenciación	29
2.3. Análisis interespecífico	30
2.3.1. Alineamiento de secuencias	31

2.3.2.	Análisis filogenético	32
	Máxima parsimonia	32
	Inferencia bayesiana	33
	Estimación de la tasa de mutación	35
2.4.	Análisis intraespecíficos: <i>métodos generales</i>	36
2.4.1.	Edición y alineamiento de secuencias	36
2.4.2.	Diversidad genética	36
2.4.3.	Estructura poblacional	37
	Árbol de genes	37
	Redes de haplotipos	38
	Análisis de la Varianza Molecular	38
	Aislamiento por distancia	39
2.4.4.	Historia demográfica	39
	Pruebas estadísticas	40
	Estadísticos de clase I.	40
	Estadísticos de clase II.	40
	Estadísticos de clase III.	41
	Skyline-plot bayesiano	41
	Filogeografía bayesiana	42
3.	Resultados	44
3.1.	Análisis interespecífico	44
3.1.1.	Alineamiento	44
3.1.2.	Análisis filogenético	45
	Máxima parsimonia	45
	Inferencia bayesiana	47
	Estimación de la tasa de mutación	49
3.2.	Sitios de Muestreo y Distribución	50
3.3.	Análisis intraespecífico de <i>Physalaemus henselii</i>	54
3.3.1.	Diversidad genética	54
	El fragmento de <i>Cyt-b</i>	54
	El fragmento de <i>D-loop</i>	54

Diversidad genética con ambos genes concatenados	56
3.3.2. Estructura genética en <i>Physalaemus henselii</i>	57
Árbol de haplotipos	57
Red de haplotipos	59
Análisis Molecular de la Varianza en <i>P. henselii</i>	62
Aislamiento por distancia	64
3.3.3. Historia demográfica	65
3.4. Análisis intraespecífico de <i>Physalaemus fernandezae</i>	71
3.4.1. Diversidad genética	71
El fragmento de <i>Cyt-b</i>	71
El fragmento de <i>D-loop</i>	72
Diversidad genética con ambos genes concatenados	73
3.4.2. Estructura genética en <i>Physalaemus fernandezae</i>	74
Árbol de haplotipos	74
Red de haplotipos	77
Análisis Molecular de la Varianza en <i>P. fernandezae</i>	79
Aislamiento por distancia	82
3.4.3. Historia demográfica	83
4. Discusión	89
4.1. Distribución	89
4.2. Relaciones interespecíficas	92
4.3. Diversidad genética y estructura poblacional	96
4.4. Historia demográfica	100
Conclusiones	104
Bibliografía	105
Índice de tablas	128
Índice de figuras	130

Apéndices	133
Apéndice I: Ejemplares utilizados para análisis filogenético	133
Apéndice II: Árboles de máxima parsimonia	135
Apéndice III: Haplotipos de <i>Physalaemus henselii</i>	136
Apéndice IV: Haplotipos de <i>Physalaemus fernandezae</i>	139
Apéndice V: Material revisado	144
Apéndice VI: Soluciones de laboratorio	150

Resumen

El género *Physalaemus* está compuesto por 45 especies de anuros distribuidas desde las regiones más cálidas hasta las regiones templadas de Sudamérica. *Physalaemus henselii* y *P. fernandezae* son dos de las especies con distribución más austral del género, ocupan gran parte de la región pampeana pero, a su vez, presentan una distribución interrumpida o disyunta a nivel de la Cuenca del Río de La Plata. Su proximidad biogeográfica, la similitud en su morfología externa y osteología, sus características etológicas y la semejanza larval entre ambas especies sugiere que son formas evolutivamente muy próximas, pero hasta el momento su relación no ha sido evaluada bajo una hipótesis filogenética.

La región pampeana constituye un gran ecotono que en parte, fue originado por pulsos históricos de avance y retroceso de una biota de stirpe guayano-brasileña y otra andino-patagónica. Estos pulsos han dejado huellas que hoy se pueden observar en el registro fósil, y en casos puntuales de especies aisladas o en distribuciones disyuntas; y pueden ser atribuidas a los intensos cambios climáticos ocurridos en la región. Adicionalmente a los cambios registrados en el clima, el litoral argentino y su inmediato Uruguayo han sido afectados por transgresiones marinas ocurridas durante el Neógeno.

En el presente trabajo se realizó un estudio filogenético y filogeográfico de dos especies de anuros: *Physalaemus fernandezae* (Müller, 1926) y *P. henselii* (Peters, 1872), con el objetivo principal de conocer los procesos históricos que actuaron sobre cada especie. Aunque el paisaje a ambos lados del Río de La Plata presente gran semejanza, el territorio Uruguayo y el sur de Brasil son atravesados por sierras de poca altura (también llamadas cuchillas). Por el contrario la provincia de Buenos Aires es mayoritariamente una llanura deprimida levemente ondulada sujeta a periodos de sequías e inundaciones.

Las principales hipótesis de trabajo son: 1- las transgresiones marinas que tuvieron lugar en el Neógeno actuaron como barrera geográfica, dando como resultado un evento vicariante entre *P. fernandezae* y *P. henselii*, y 2- *P. fernandezae* y *P. henselii* presentan diferentes patrones filogeográficos y ello se debe a diferentes características del terreno en donde se distribuyen.

El estudio filogenético fue realizado utilizando exclusivamente caracteres moleculares, aplicándose análisis de máxima parsimonia y de inferencia bayesiana. Para los estudios filogeográficos se muestrearon poblaciones cubriendo la totalidad del área de distribución de

cada especie. Con las muestras obtenidas se realizaron análisis de diversidad genética, estructura poblacional e historia demográfica.

El análisis filogenético indica que *P. fernandezae* y *P. henselii* son especies hermanas y que su tiempo de divergencia coincide con la transgresión marina ocurrida hace 15 Ma. En cuanto a los resultados filogeográficos, cada especie presenta un patrón notablemente diferente. *Physalaemus fernandezae*, que se distribuye en los terrenos llanos de la provincia de Buenos Aires, no presenta una fuerte estructura filogeográfica. En cambio *P. henselii* con una distribución en terrenos más ondulados de Uruguay y el sur de Brasil presenta una fuerte estructura filogeográfica. Para esta especie existen tres linajes principales, uno distribuido desde el sureste de Brasil hasta el litoral argentino, llegando hasta “El Palmar”, otro que se distribuye en el centro y sureste de Uruguay, y un tercero únicamente hallado en el sudeste de Brasil. Las semejanzas morfológicas, etológicas y ecológicas entre las especies estudiadas sugieren que las diferencias de patrón filogeográfico pueden estar dadas por factores externos, como el clima o el terreno. Los análisis realizados para revelar la historia demográfica de las especies estudiadas muestran estabilidad demográfica histórica o indicios de expansión reciente. En ninguna de las especies fue detectado un cuello de botella, indicando que los cambios climáticos del Pleistoceno no causaron gran efecto sobre ellas. El análisis de filogeografía bayesiana mostró un centro de origen de *P. fernandezae* ubicado aproximadamente en el centro de su distribución, en el sudoeste de la bahía de Samborombón, y desde allí se dispersó hasta ocupar su área de distribución actual. En *P. henselii* el centro de origen fue propuesto para el sudeste de Brasil - noreste de Uruguay, y desde allí se dispersó utilizando tres rutas principales: una hacia el norte, la segunda hacia el sureste de Uruguay, y una tercera hacia el oeste, llegando hasta el litoral argentino.

Abstract

The genus *Physalaemus* consists of 45 species of frogs distributed from warm to temperate regions of South America. *Physalaemus henselii* and *P. fernandezae* are two of the southernmost species of the genus. They occur at most of the Pampas, but shows a disjunct distribution over the Río de La Plata basin. Their biogeographic proximity, similarity in external morphology, osteology, larval morphology and ethological features between the two species suggest that they are very closely related, but so far their relationship has not been evaluated on a phylogenetic viewpoint.

The Pampas is a major ecotone, which in part was originated by historical forward and reverse pulses of a Guayano-Brazilian and Andean-Patagonian biota. These pulses have left traces that can be observed today in the fossil record, and in particular cases of isolated or disjunct species distributions, and can be attributed to the intense climate changes in the region. In addition, the Argentine and Uruguayan coast has been affected by marine transgressions occurred during Neogene.

In this work was performed a phylogenetic and phylogeographic study of two species of frogs: *Physalaemus fernandezae* (Müller, 1926) and *P. henselii* (Peters, 1872), with the aim understand the historical processes that affected each species. Although the landscape at both sides of the Río de La Plata is comparable, the Uruguayan territory and southern Brazil areas are crossed by low mountain ranges (called cuchillas). In contrast, Buenos Aires province shows a mostly smoothly undulating plain, with drought and flooding periods.

The main working hypothesis are: 1 - marine transgressions that occurred during Neogene acted as geographical barriers, resulting in vicariant events splitting *P. fernandezae* and *P. henselii*, and 2 - *P. fernandezae* and *P. henselii* have different phylogeographic patterns which were originated due to topographical differences.

A phylogenetic study was conducted using molecular characters, applying maximum parsimony analysis and Bayesian inference. For phylogeographic studies populations of each species were sampled covering their entire range of distribution. Analysis of genetic diversity, population structure and demographic history were performed.

The phylogenetic analysis showed that *P. fernandezae* and *P. henselii* are sister species. Their divergence time coincides with the marine transgression occurred 15 Ma ago. The phylogeographic results shows that each species has a markedly different pattern. *Physalaemus*

fernandezae, which is distributed in the flat lands of the province of Buenos Aires, do not show phylogeographic structure. However, *P. henselii*, distributed over the undulating terrains of Uruguay and southern of Brazil, has a strong phylogeographic structure. *Physalaemus henselii* has three main lineages, one of them distributed from southeastern of Brazil to the Argentine coast, reaching “El Palmar”, another distributed in the central and southeastern of Uruguay, and third only found in southeastern of Brazil. The morphological, behavioral and ecological similarities between *P. fernandezae* and *P. henselii* suggest that the differences in the phylogeographic patterns are given by external factors, such as differences of climate or terrain. The study of the demographic history of both studied species reveals signs of historic demographic stability or recent demographic expansion. In none of the species was detected bottleneck associated to Pleistocene climate changes. Bayesian phylogeography analysis indicate a center of origin of *P. fernandezae* located approximately in the middle of its distribution, southwest to the bahía de Samborombón, and dispersed from there to occupy the present distributional range. The center of origin of *P. henselii* is proposed at southeastern Brazil - northeast Uruguay, and from there dispersed using three main routes: one to the north, the second to the southeast of Uruguay, and a third to the west, reaching the Argentine mesopotamian.

CAPÍTULO 1

Introducción

La diversidad de formas de los seres vivos es el resultado de la historia de la vida sobre la tierra, y es expresada en cambios de forma a través del espacio y el tiempo (Crisci et al., 2000). La idea de cambio de forma a través del tiempo fue consolidada en el pensamiento científico a partir de la obra “*El origen de las especies*” (Darwin, 1859), donde se introduce el tiempo conectando la diversidad de formas como concepto de evolución. Más de 100 años después, Croizat (1964) publica su libro “*Espacio, tiempo y forma*”, agregando una nueva componente a la evolución, el espacio. En cada proceso evolutivo estas tres componentes actúan e interactúan de manera conjunta y continua. A pesar de ello, existen disciplinas que abordan como eje principal solo algunas de ellas. Por ejemplo, en la sistemática filogenética la forma y el tiempo son los principales ejes para generar hipótesis de relaciones. Por otra parte, el espacio y la forma son objeto de estudio de las disciplinas ecológicas, y la biogeografía enfoca su estudio principalmente al espacio y el tiempo (Morrone, 2000).

La biogeografía, puede ser definida de manera simple como “el estudio de las distribuciones geográficas de los seres vivos”, pero a su vez, es una disciplina que engloba casi una decena de enfoques con diferentes metodologías (Crisci et al., 2000). Cada uno de estos enfoques presenta diferente relación con otras disciplinas y apuntan a responder distintas inquietudes: delimitar áreas, reconstruir la historia del taxón o reconstruir la historia de las

áreas.

Uno de los últimos enfoques desarrollados para generar hipótesis acerca de patrones biogeográficos es la *filogeografía*. Esta disciplina surge a fines de los '80 y es definida como “*el estudio de los principios y procesos que determinan la distribución geográfica de los linajes genealógicos, especialmente dentro de taxa cercanamente emparentados*” (Avise et al., 1987). Este enfoque se basa en el estudio del espacio, tiempo y forma; en su metodología se usan árboles genealógicos, pero también se utilizan conceptos que provienen de la genética de poblaciones y considera la información geográfica como punto fundamental. Cabe también remarcar que la fuente de caracteres es exclusivamente molecular, dado que a un nivel intraespecífico éstos presentan ciertas ventajas sobre los caracteres morfológicos. La dificultad de relacionar la filogeografía a otras disciplinas radica en su naturaleza mixta, donde se integran conceptos que provienen de disciplinas micro y macroevolutivas (Figura 1.1). Las primeras hacen foco en los procesos que actúan a nivel de poblaciones e individuos, y las macroevolutivas se enfocan por encima del nivel de especie (Avise et al., 1987; Avise, 2000; 2009).

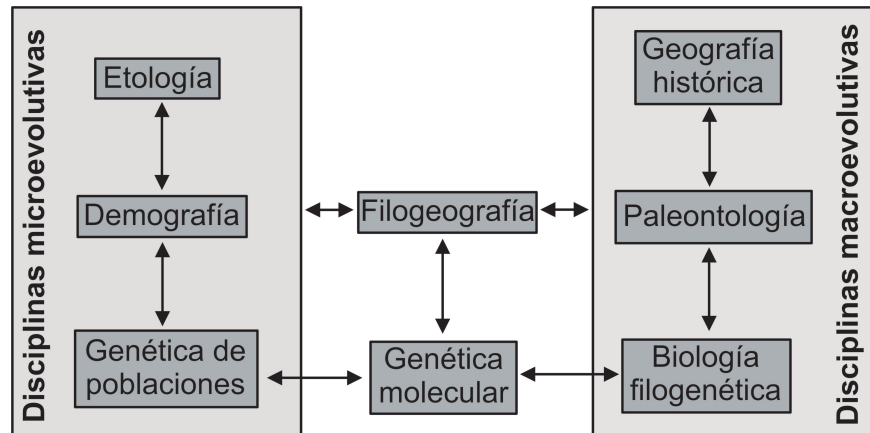


Figura 1.1: La filogeografía como punto de unión entre disciplinas micro y macroevolutivas (Modificado de Avise, 2000).

La interacción entre procesos y patrones permite, usando datos genéticos del presente, hacer inferencia acerca de cambios históricos en el medio biótico y generar hipótesis acerca de lo ocurrido en el medio físico. De esta manera, los estudios filogeográficos pueden direccionarse a generar contribuciones en diversas áreas del conocimiento, como ser: modos de especiación (e.g. Moritz et al., 2000; Noonan & Wray, 2006), biología de la conservación

(Moritz, 2002) y paleoclimatología (Hewitt, 2000; 2004), entre otras.

La distribución espacial de los linajes de genes permite identificar patrones que señalen la existencia de antiguas barreras geográficas o ambientales que oportunamente limitaron el flujo génico entre las poblaciones (Roderick, 1996; Avise, 2000). Por ejemplo, cuando se interrumpe el flujo génico entre dos poblaciones, éstas comenzarán a diferenciarse genéticamente hasta que todos los alelos dentro de cada población lleguen a tener un ancestro común más cercano entre sí que con los alelos de otra población. A este estado se lo denomina monofilia recíproca y se alcanza luego de que los alelos han transitado por estados previos de parafiletismo y polifiletismo (Avise, 2000). Si se hacen inferencias sobre el pasado histórico de las poblaciones cuando éstas todavía no alcanzaron el estado de monofilia, es posible hallar todavía variación alélica ancestral que puede ser interpretada erróneamente como debida a flujo génico interpoblacional (Schaal & Olsen, 2000).

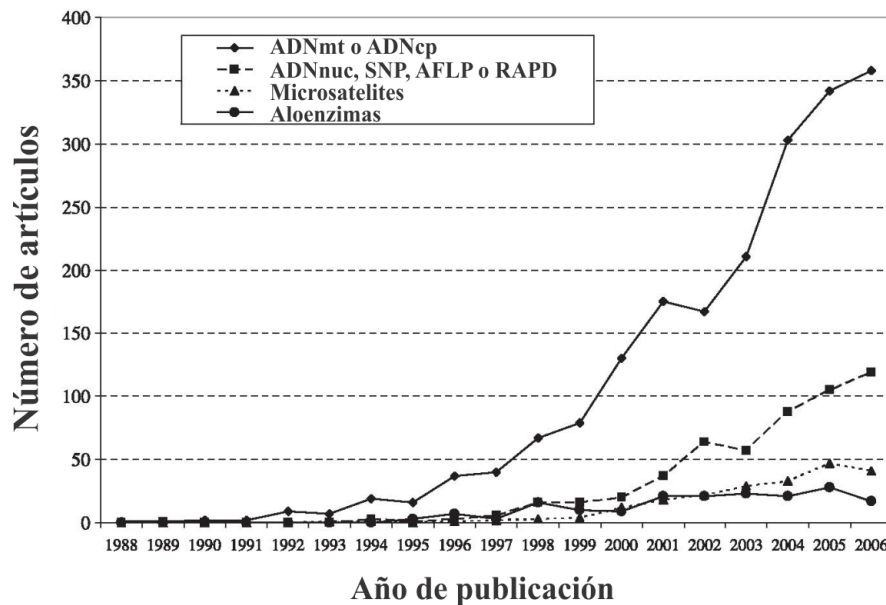


Figura 1.2: Diferencia en cantidad de publicaciones con los distintos marcadores moleculares utilizados (modificado de Berheregaray, 2008).

El crecimiento de la filogeografía se debe en gran parte al avance tecnológico, teórico y analítico. El desarrollo tecnológico dió acceso a la relativamente rápida y fácil obtención de secuencias de ADN, mientras que la aplicación de la coalescencia, proveniente de la genética de poblaciones, da un marco teórico (Rosenberg & Nordborg, 2002). A 20 años de los comienzos de la filogeografía, Berheregaray (2008) hace una revisión bibliográfica exhaus-

tiva donde analiza diferentes aspectos del crecimiento de la disciplina. Uno de los puntos que analiza son los marcadores moleculares más utilizados; sus resultados muestran como en la mayoría de los estudios se utilizan marcadores de descendencia matrilineal, secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) en animales o cloroplastos (ADNcp) en plantas (Figura 1.2). También se remarca una tendencia creciente a utilizar de manera conjunta secuencias de descendencia matrilineal con marcadores nucleares. En Sudamérica la filogeografía es un disciplina en continuo desarrollo, donde la mayor parte de los trabajos hacen referencia a regiones tropicales y subtropicales (Soltis et al., 2006; Beheregaray, 2008).

Existen diversas características que hacen que el ADNmt sea el más utilizado en estudios filogeográficos. Actualmente es sabido que la longitud total del genoma mitocondrial puede variar entre 15-21 kpb (Sano et al., 2005), y que al igual que en los genes nucleares, pueden darse mutaciones estructurales: reordenamientos (cambios relativos de posición), duplicaciones y/o deleciones. En los anuros, estos cambios de tipo estructural ya han sido reportados. En el género *Mantella* puede existir un pseudogen de un (t)RNA, reordenamientos posicionales de genes y también repetición de genes, como por ejemplo la región control duplicada (Kurabayashi et al., 2006). En otros representantes de la familia Mantellidae la región control está triplicada o presenta diferentes longitudes (Kurabayashi et al., 2008). Para poder detectar este tipo de reordenamientos se requiere conocer el genoma mitocondrial completo, y quizá es por este motivo que hasta el momento son pocos los trabajos que abordan este tipo de mutaciones estructurales en las mitocondrias. Un trabajo reciente (Irisarri et al., 2012) muestra a gran escala cómo estos reordenamientos tienen información evolutiva dentro de anuros, pero todavía no se ha evaluado si proporcionan información a baja escala taxonómica (dentro de especies).

En filogeografía se utilizan secuencias de nucleótidos del ADN, y a diferencia de los reordenamientos previamente mencionados, son las mutaciones puntuales las que proveen los caracteres para inferir procesos evolutivos (e.g. Jang et al., 2011; Koscinski et al., 2009; Lessa et al., 2010). Las características que hacen que el ADNmt sea el más utilizado para examinar la distribución geográfica de los linajes de genes es: **1)** es una molécula fácil de aislar y se presenta en varias copias por célula, **2)** presenta un genoma haploide que usualmente no recombina y su herencia es matrilineal (Birky, 2001), **3)** exhibe una alta tasa de mutación (Brown et al., 1979), característica relevante cuando se trabaja a nivel poblacional

o específico.

Las variantes o haplotipos del ADNmt registran la historia matrilineal de los eventos mutacionales, estos pueden conectarse mediante un árbol de genes y a su vez superponerlo en la distribución geográfica del grupo con el fin de interpretar los procesos evolutivos (Avise, 2000). La genealogía de genes y la demografía poblacional se encuentran íntimamente relacionadas; la teoría de la coalescencia ofrece el marco teórico para el estudio de esta relación (Avise, 2000). El concepto de coalescencia fue desarrollado principalmente por Kingman (1982), quien demostró que la unión de linajes hacia un ancestro común se describe por un proceso matemático que denominó *n-coalescent*. En ausencia de selección, los diferentes linajes observados se relacionan y convergen hacia atrás en el tiempo con sus linajes ancestrales; cada vez que los linajes convergen nos encontramos ante un evento de coalescencia, el cual se produjo en determinado tiempo de coalescencia (Figura 1.3).

En la Figura 1.3A se representa una población hipotética ($N=10$), con ausencia de selección y que se mantiene constante en el tiempo. Se puede observar que de generación a generación surgen nuevos alelos por mutación, que ocasionalmente pueden transformarse en linajes mientras que otros se pierden. En el modelo, todos los alelos de un gen que pertenecen a una misma generación derivan de un alelo de la generación predecesora y ocasionalmente derivan de un único alelo ancestral. Si nos posicionamos en el presente con nuestros datos, podemos descifrar la historia de nuestras muestras. Cada vez que dos linajes se juntan en un ancestro se produce un evento de coalescencia (*o coalescen*). En la Figura 1.3B se observa la reconstrucción genealógica de las muestras tomadas de la población, donde se remarcen los eventos de coalescencia y los tiempos de coalescencia. De esta forma el coalescente describe el linaje genético de una muestra de alelos en una población y utiliza esta información para hacer predicciones sobre patrones de variación genética. Este linaje genético de una muestra, referido como “genealogía de genes” (Figura 1.3B), registra la historia matrilineal de eventos mutacionales de las variantes (secuencias) de ADNmt, conocidas como haplotipos, los cuales podrán ser conectados de un modo filogenético y expresado en un “árbol de genes” (Wakeley, 2007; Avise, 2000; 2009). El concepto de árbol de genes y el proceso coalescente han sido centrales en el surgimiento de la filogeografía como subdisciplina de la biogeografía (Avise, 2009).

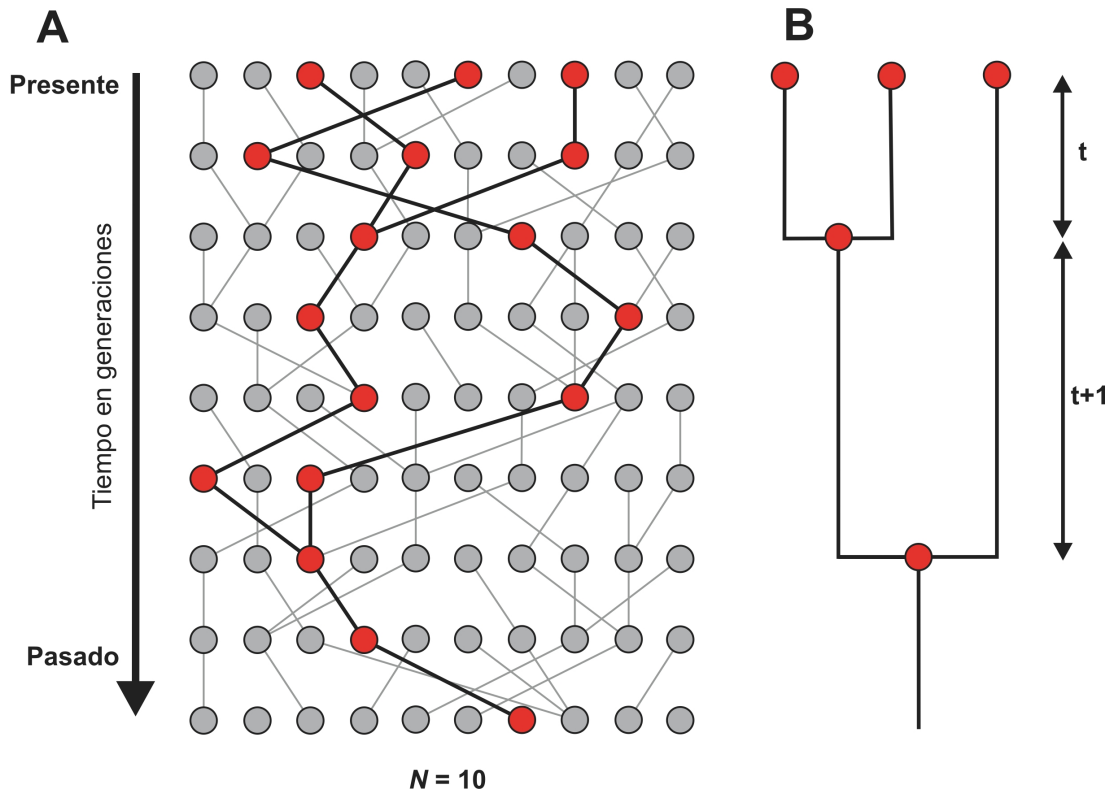


Figura 1.3: (A) Población hipotética, donde cada fila corresponde a una generación. En el esquema se puede observar como algunos individuos no dejan descendencia, y como algunos individuos generan nuevos linajes por medio de eventos de mutación. Con rojo se remarca la reconstrucción genealógica a partir de tres individuos del presente, puede notarse como los tres coalescen a un único antecesor común. (B) La reconstrucción genealógica, donde son remarcados los tiempos de coalescencia (modificado de Rosenberg & Nordborg, 2002).

Algunos de los estadísticos más comunes basados en la teoría de la coalescencia, la D de Tajima (1989) y la distribución de las diferencias pareadas (*mismatch distribution*) (Rogers & Harpending 1992), son utilizados para explorar desequilibrios o expansiones demográficas dentro de las poblaciones. Éstos estadísticos utilizan el modelo de Wright-Fisher (Fisher, 1932; Wright, 1931; 1951) como hipótesis nula para poder evaluar si nuestros datos se desvían de los valores esperados bajo el modelo. Los análisis bajo el modelo coalescente pueden determinar la genealogía de los alelos, el tiempo hacia el pasado en que divergieron de un único alelo y parámetros demográficos como el tamaño efectivo histórico de la población (Furlong & Brookfield, 2001). Avise (2000) demuestra la conexión que existe entre el tamaño efectivo poblacional y la probabilidad que se fije una mutación en la población. Bajo la teoría del coalescente también se pueden evaluar nuestros datos utilizando modelos más

complejos. En ellos se puede variar los tiempos de divergencia, tamaños poblacionales, migraciones, crecimientos demográficos, y de esta forma obtener hipótesis alternativas para contrastar nuestros datos. Knowles & Maddison (2002) proponen el nombre de *filogeografía estadística* y discuten la importancia de tener escenarios alternativos para la evaluación de los datos. Otro enfoque es el llamado *filogeografía bayesiana*, recientemente desarrollado por Lemey et al. (2009; 2010), el cual incorpora las cadenas de Markov Monte Carlo en la inferencia filogeográfica para reconstruir áreas de origen y dispersión de los linajes a lo largo del tiempo.

1.0.1. El área de estudio

El área de estudio comprende la región que biogeográficamente es denominada Provincia de la Pampa (Cabrera & Willink, 1973; Morrone, 2001), Distrito Pampásico (Cabrera & Yepes, 1940) o Dominio Pampásico (Ringuelet, 1961). Esta región abarca gran parte de las provincias de Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires en Argentina, la República Oriental del Uruguay y el sur de Rio Grande do Sul, en Brasil. Se caracteriza por sus extensas praderas emplazadas en una región llana que en algunos sectores presenta elevaciones no mayores a los 1200 msnm y un clima templado con un gradiente de temperatura y humedad que disminuye desde el noreste hacia el sudoeste (Cabrera & Willink, 1973). Desde una apreciación biogeográfica, diferentes estudios coinciden en que existe una conexión histórica entre la biota del sur de Brasil, Uruguay, sur de la provincia de Buenos Aires y las Sierras Pampeanas; algunos autores también incluyen aquí a las Sierras Subandinas. Esta conexión delimita un área en forma de herradura invertida llamada “dominio Pampásico” o “arco Peripampásico” (Ringuelet, 1961; Crisci et al., 2001). Ringuelet (1961) propone que la “fauna pampásica” es parte de un gran ecotono que fue causado por pulsos históricos de avances y retrocesos de una estirpe de biota guayano-brasileña y otra andino-patagónica. Éstos pulsos han dejado huellas que hoy se representan en especies aisladas o distribuciones disyuntas. Existen relictos de opiliones y gasterópodos con origen andino-patagónico que componen la fauna pampásica, leptotiflópodos y el caso de la mojarra desnuda de Valcheta *Gymnoscharacinus bergii* que estarían representando relictos de un avance de la estirpe guayano-brasileña. En cuanto a las distribuciones disyuntas un ejemplo es *Melanophryniscus montevidensis*, un anuro endémico de una delgada faja costera de Uruguay y sur de Rio Grande do Sul, y *Mela-*

nophryniscus aff. montevidensis distribuido en las Sierras Bonaerenses, Sierras de San Luis y Córdoba, evidenciando una conexión histórica entre las tres regiones.

La distribución espacial de la biota se ve altamente influenciada por los factores climáticos de una región; en este sentido, es difícil explicar las distribuciones de muchos organismos sin contemplar los cambios en un contexto geológico.

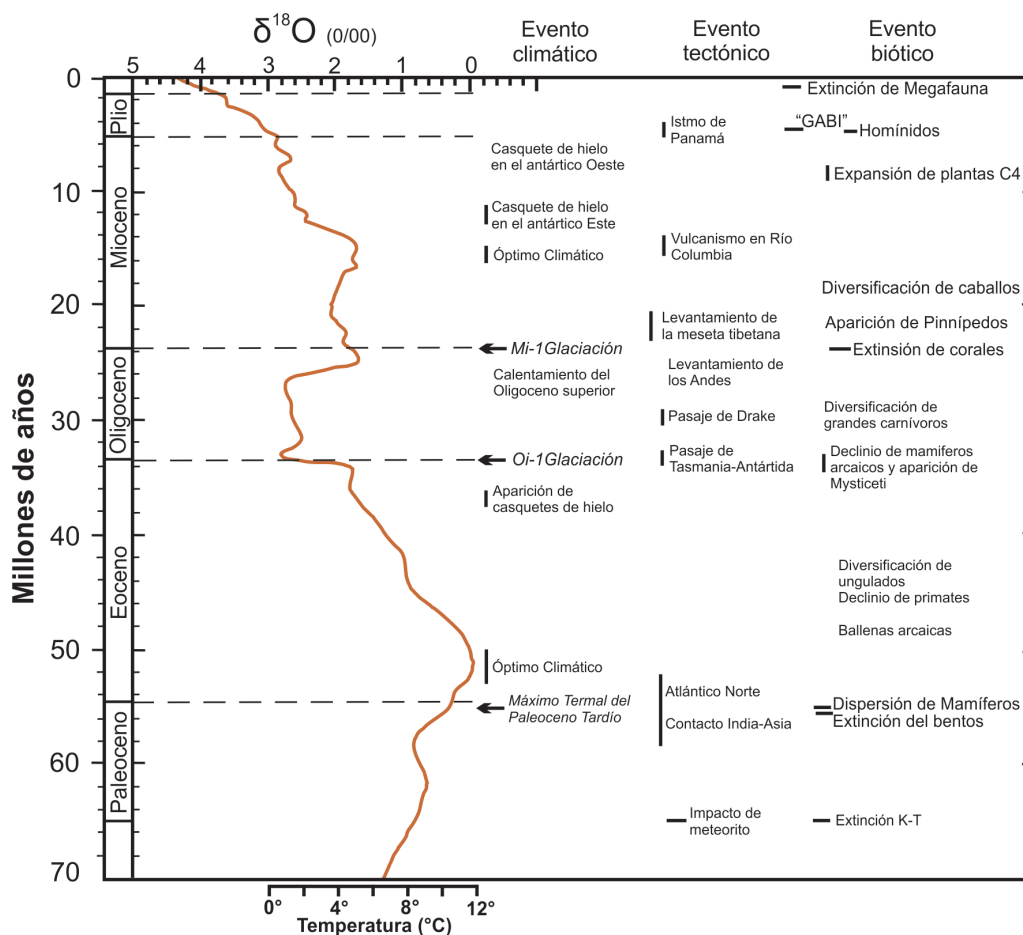


Figura 1.4: Variación climática del océano, durante el Cenozoico, inferida a partir de isótopos de oxígeno. Con la línea naranja se muestra la concentración de oxígeno. También se remarcan algunos eventos climáticos, geológicos y bióticos (modificado de Zachos et al., 2001).

El planeta Tierra sufrió profundos cambios climáticos durante el Cenozoico, especialmente a partir del Mioceno (23,03-5,32 Ma) cuando comienza un período de transición para toda Sudamérica. En la Patagonia se encuentra bien documentado como fue cambiando la composición de la flora. Durante el Mioceno temprano el paisaje es dominado por elementos tropicales, los que sugieren temperaturas elevadas y gran humedad, pasando por elementos de Dominio Chaqueño durante el Mioceno medio y hacia el final el establecimiento de co-

comunidades xerófilas (Barreda & Palazzesi, 2007). A su vez, en Amazonia, el levantamiento de los Andes produjo un cambio en el sentido de drenaje del Río Amazonas. Este proceso fue acompañado de cambios ambientales que promovieron la diversificación de muchos organismos (ver revisión de Hoorn et al., 2010). Los datos paleoclimáticos sugieren que a comienzos del Mioceno existe un lapso de clima frío que originó el manto de hielo de Antártida (glaciación Mi-1), pero durante el Mioceno Medio la temperatura global asciende hasta un momento de “optimum climaticum” cálido (Figura 1.4), esto produce una disminución en el manto de hielo que cubre la Antártida (Zachos et al., 2001). Haq et al. (1987) presentan las fluctuaciones del nivel de mar desde el Triásico, y esto promueve posteriores estudios a escalas más pequeñas pero con mayor detalle (e.g. Kominz et al., 2008). Para el Mioceno el continente sudamericano se ve invadido por transgresiones marinas que cubren gran parte del continente; el “Mar Amazonas” cubrió la región donde hoy se emplaza la cuenca del Amazonas, y por la zona sur del continente ingresa el “Mar Paranaense” (Räsänen et al., 1995; Webb 1995). La cronología de las transgresiones marinas es un tema que se encuentra en discusión, y existen distintos criterios acerca de un contacto entre el “Mar Paranaense” y el “Mar Amazónico”. Hernández et al. (2005) demuestran que no existió conexión entre estas dos transgresiones y además aportan nuevos datos sobre su cronología. El mar paranaense invadió gran parte del territorio Argentino, sur de Paraguay, Bolivia y regiones costeras de Uruguay. Se registran dos eventos: un primer pulso datado entre 15-13 Ma y un segundo pulso entre 10-5 Ma (Hernández et al., 2005). Los autores pueden diferenciar los dos pulsos en registros ubicados en el sector oeste y aclaran que según se evidencia en la cuenca de Río Colorado y el Río Salado, en zonas costeras (e.g. Buenos Aires o Puerto Madryn), la transgresión marina pudo ocupar completamente el periodo entre 15-5 Ma. En consecuencia, estas transgresiones marítimas separaron los ambientes terrestres de Uruguay y sudeste de Brasil (Cratón Brasileiro) de las Guayanas (Cratón de las Guayanas) y del sur de Buenos Aires y otras tierras emergentes de Patagonia (Figura 1.5). En este sentido, por sus características fisiológicas, los anfibios no pueden utilizar ecosistemas marinos (Duellman & Trueb, 1986), por lo tanto, es de esperar que las transgresiones marinas hayan funcionado como barreras biogeográficas afectando a los anfibios que para ese momento ocupaban el área pampaena.

Durante las transgresiones marinas y a posterior de su retirada se registraron innumerables cambios climáticos que afectaron a diferentes escalas el continente sudamericano. Cuando

las transgresiones marinas se retiraron, dieron lugar al desarrollo de extensas praderas que se extendieron desde Patagonia al resto de Sudamérica. Estas praderas alcanzaron su plenitud durante el Plioceno (5,32-1,81 Ma), período conocido como la Edad de las Planicies del Sur (Pascual et al., 1996; Ortiz Jaureguizar, 1998).



Figura 1.5: Transgresiones marinas en Sudamérica que formaron los mares Amazónico y Paranense durante el Mioceno (extraído y modificado de Ortiz Jaureguizar & Cladera, 2006).

Para fines del Plioceno diferentes eventos geológicos tuvieron influencia sobre los ecosistemas, la elevación de la Cordillera Central entre Argentina y Chile generó ambientes extremadamente xéricos debido al impedimento del paso de lluvias y vientos húmedos (Pascual et al., 1996; Alberdi et al., 1997; Kleinert & Strecker, 2001; Ortiz Jaureguizar & Cladera, 2006). La formación del Istmo de Panamá durante el Plioceno tardío (3 a 2,5 Ma) (Webb,

1985; Graham, 1992) detuvo la circulación marina entre los océanos Pacífico y Atlántico y facilitó la formación de la masa de hielo ártica (Shackleton et al., 1984). Los registros geológicos y bióticos del Terciario muestran largos períodos de uniformidad en las condiciones ambientales, esporádicamente interrumpidos por períodos geológicos cortos pero muy disruptivos, que causaron cambios drásticos en la composición taxonómica y ecológica de las biotas. Por otro lado, los cambios climáticos más frecuentes y paulatinos durante el Cuaternario actuaron expandiendo o contrayendo el área de distribución de muchos taxa, comunidades y biomas (Pascual & Ortiz Jaureguizar, 1990; Pascual et al., 1996).

Específicamente, las glaciaciones durante el Pleistoceno en Sudamérica fueron fundamentales en la modelación de los biomas, en función del avance y retirada de los glaciares y la correlación de esta dinámica con los cambios en el nivel del mar, climáticos y por supuesto ambientales. Esto causó la retracción y expansión en alternancia de sabanas y estepas áridas y bosques tropicales y subtropicales más húmedos (Marshall & Cifelli, 1990). Estos cambios ambientales promovieron el desarrollo de teorías para explicar la dinámica de la biota. Por ejemplo la Teoría de Refugios (Haffer, 1969) propone que los cambios ambientales que interrumpen el paisaje tienen un gran efecto sobre la biota promoviendo procesos de especiación o extinción. Los estudios filogenéticos, y particularmente los filogeográficos, son herramientas muy potentes para evaluar, por ejemplo, si las distribuciones continuas se deben a: 1- contactos secundarios de poblaciones que permanecieron aisladas o 2- una dispersión reciente. Los contactos secundarios entre linajes que permanecieron aislados no siempre terminan en un proceso de especiación y es en este punto donde los estudios filogeográficos toman mayor relevancia (Avice, 2000).

Tradicionalmente se ha considerado que los anfibios son animales que presentan un acotado desplazamiento individual, altamente fieles a sus sitios de oviposición y que tienden a concentrarse para su reproducción (Beebee, 1996; Gamble et al., 2007; Wells, 2007). Éstas características los transforman en un modelo muy atractivo para realizar estudios genéticos y filogeográficos (Zeisset & Beebee, 2008). Algunos estudios muestran que las especies de anuros pueden interrumpir el flujo génico entre sus poblaciones por la presencia de accidentes geográficos o bien por la discontinuidad del hábitat (e.g. McRae, 2006; Wang et al., 2012); procesos históricos que pueden ser revelados mediante estudios filogeográficos. La mayor parte de la información acerca de patrones filogeográficos en anuros son provenientes de

estudios realizados en el hemisferio norte, pero en Sudamérica es una disciplina en incipiente desarrollo. Hasta el momento la mayor parte de los estudios filogeográficos realizados en anuros hacen referencia a regiones tropicales y subtropicales (Soltis et al., 2006; Beheregaray, 2008; Carvanal et al., 2009; Fouquet et al., 2012). En las regiones templadas de Sudamérica la mayor información proviene de taxones como reptiles, mamíferos y plantas, con un gran sesgo al territorio patagónico (e.g. Kim et al., 1998; Premoli et al., 2000; Pastorino & Gallo, 2002; Muellner et al., 2005; Avila et al., 2006; Morando et al., 2003; 2004; 2007; Himes et al., 2008; Jakob et al., 2009; Acosta & Premoli, 2010; Cosacov et al., 2010; Lessa et al., 2010; Breitman et al., 2012; Camargo et al., 2013). La información de especies co-distribuidas en la Patagonia ha permitido establecer patrones filogeográficos generalizados (Sérsic et al., 2011) y con ellos poder elaborar hipótesis más complejas. Muy diferente es el conocimiento actual de los anuros en las regiones templadas; únicamente se realizaron estudios filogeográficos en algunos anfibios de Chile (Correa et al., 2010; 2012), en una especie del Noroeste Argentino (Koscinski et al., 2009) y pocos anuros de la región patagónica (Martinazzo, 2011; Nuñez et al., 2011). Hasta el momento, el único trabajo filogeográfico con anuros de la región pampeana es una tesis doctoral reciente (Langone, 2013), aún no publicada.

En el presente trabajo de tesis se realiza un estudio filogeográfico de dos especies de anuros: *Physalaemus fernandezae* (Müller, 1926) y *P. henselii* (Peters, 1872) con el objetivo principal de reconocer los procesos históricos que actuaron sobre cada especie. Ambas habitan en la Subregión Chaqueña, provincia de la Pampa (Morrone, 2001), pero sus distribuciones son prácticamente disyuntas, sólo se solapan en una pequeña región de las cercanías de la Cuenca del Río de La Plata. *Physalaemus henselii* se distribuye principalmente en Uruguay y sur de Brasil, mientras que *P. fernandezae* en la provincia de Buenos Aires (Barrio, 1964, 1967; Gallardo, 1965; Núñez et al., 2004). Aunque el paisaje a ambos lados del Río de La Plata presente gran semejanza, el territorio uruguayo y sur de Brasil es atravesado por sierras de poca altura (también llamadas “cuchillas”), que en muchos casos funcionan como líneas divisoras de aguas. Por el contrario la provincia de Buenos Aires es una llanura deprimida levemente ondulada sujeta a periodos de sequías e inundaciones (e.g. Deschamps et al., 2003). Una hipótesis a evaluar es que éstos anuros con el mismo tamaño corporal y los mismos hábitos de vida, presentan diferente patrón filogeográfico y ello se debe a las características del terreno donde se distribuyen. A pesar de no existir una hipótesis filogenética para

el género, la bibliografía sugiere que son especies cercanamente relacionadas. Por lo tanto también se presenta un análisis filogenético mediante el uso de marcadores moleculares, a fin de evaluar su relación de parentesco.

1.0.2. El grupo de estudio

En América del Sur se encuentra la mayor diversidad de anfibios del mundo (Duellman, 1999; Stuart et al., 2008). El avance de las técnicas moleculares provocó, en los últimos años, un importante aporte en el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre los grandes grupos de anfibios (e.g. Frost et al., 2006; Pyron & Wiens, 2011). Además, año tras año, continúa en aumento la comprensión de las relaciones dentro de grupos menos inclusivos (e.g. Hedges et al., 2008; Faivovich et al., 2012; Blotto et al., 2013). A pesar de ello, muchas relaciones dentro de los grupos todavía permanecen inciertas; del mismo modo los mecanismos responsables su origen y diversificación (Soltis et al., 2006).

El género *Physalaemus* presenta 45 especies que se distribuyen en el Neotrópico (Frost, 2013). Hasta el momento no existe una hipótesis filogenética acerca de sus relaciones interespecíficas, incluso su monofilia ha sido cuestionada debido a la ausencia de sinapomorfías que lo sustenten (Cannatella & Duellman, 1984). Grant et al. (2006) agrupan a los géneros *Edalorhina*, *Engystomops*, *Eupemphix*, *Physalaemus*, *Pleurodema*, *Pseudopaludicola* y *Somuncuria* en la familia Leiuperidae. Resultados posteriores proponen que *Pseudopaludicola* se anida en el clado Leptodactylidae y de esta manera Leiuperidae pierde su condición de monofilia (Lourenço et al., 2008). Posteriormente, Pyron & Wiens (2011) recuperan a los Leiuperidae (*sensu* Grant et al., 2006) relacionados a un grupo más amplio y le dan el estatus de subfamilia Leiuperinae, dentro de Leptodactylidae. Un trabajo reciente de Faivovich et al. (2012), resuelve las relaciones dentro del género *Pleurodema*, y adicionalmente, incluye a *Eupemphix* como sinónimo junior de *Physalaemus* y a *Somuncuria* dentro de *Pleurodema*. De esta forma la subfamilia Leiuperinae queda constituida por los géneros *Pleurodema*, *Edalorhina*, *Engystomops*, *Physalaemus* y probablemente *Pseudopaludicola*.

Lynch (1970) en su revisión de *Physalaemus* incluye a los géneros *Engystomops* y *Eupemphix* en sinonimia con *Physalaemus* y define cuatro grupos de especies: grupo *P. biligoni-gerus*, grupo *P. cuvieri*, grupo *P. signifer* y grupo *P. pustulosus*. La revisión taxonómica más reciente, realizada por Nascimento et al. (2005) revalida los géneros *Engystomops* (=grupo

de especies *P. pustulosus sensu* Lynch) y *Eupemphix* (recientemente incluido en *Physalaemus*; Faivovich et. al., 2012), y establece grupos de especies dentro del género *Physalaemus*. En este análisis basado en morfología externa, patrones de color y caracteres osteológicos, se definen siete grupos de especies dentro del género *Physalaemus*. Según la agrupación propuesta por Nascimento et al. (2005) las especies *Physalaemus fernandezae*, *P. henselii* y *P. riograndensis* componen la totalidad de los representantes del grupo de especies *P. henselii*.

Hasta el momento, éstos ordenamientos taxonómicos dentro de *Physalaemus* (Lynch, 1970; Nascimento et al., 2005) no fueron realizados utilizando métodos de la sistemática filogenética. La similitud morfológica, osteológica, etológica, la proximidad biogeográfica y semejanza larval entre *P. henselii* y *P. fernandezae* sugieren que son formas cercanamente relacionadas (Barrio, 1964; 1965; Lobo, 1996; Nascimento et al., 2005; Alcalde et al., 2006; Kolenc et al., 2006). A su vez, la evidencia cariológica y del desarrollo larval no apoyan la inclusión de *P. riograndensis* en grupo de especies *P. henselii* (Borteiro & Kolenc, 2007; Tomatis et al., 2009; Vera Candioti et al., 2011).

***Physalaemus henselii* (Peters, 1872)**

De las 45 especies que presenta el género, *P. henselii* (Figura 1.6) es una de las especies con distribución más austral, ocupando el sur del estado de Santa Catarina y Rio Grande do Sul en Brasil, casi todo el territorio de Uruguay y algunas localidades puntuales para las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires (Isla Martín García) en Argentina (Barrio, 1964; 1967; Núñez et al., 2004; Vaira et al., 2012). También fue reportada para Paraguay (Barrio, 1964), pero este material se encuentra muy deteriorado y no es posible hacer una determinación precisa (Brusquetii & Lavilla, 2006). Casi la totalidad de su distribución se encuentra sobre el Cratón del Río de La Plata; éste se posiciona en el Sudeste de Brasil, estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul y el territorio Uruguayo (Saalman et al., 2006; Rapela et al., 2007). En la última categorización del estado de conservación de anfibios realizada en Argentina fue clasificada como especie “Vulnerable” en nuestro país, esto es debido a que su distribución en Argentina es muy acotada (Vaira et al., 2012). Por lo contrario, en Uruguay tiene el status de “Preocupación Menor” (Maneyro & Langone, 2001).

Es un anuro de pequeño tamaño, cuya tierra típica se encuentra en Rio Grande, estado de Rio Grande do Sul, Brasil. Hensel (1867) en su trabajo “*Las contribuciones al conoci-*



Figura 1.6: *Physalaemus henselii* (Peter, 1872).

miento de Vertebrados del Sur de Brasil” aporta algunos datos sobre una pequeña rana bajo el nombre de *Gomphobates Kroyeri*? Reinhardt & Lütken, pero no da número de referencia ni tampoco la describe como especie. Peters (1872) tampoco proporciona referencia de un material tipo, pero le asigna el nombre específico *Paludicola Henselii*, en honor a la descripción de Hensel. Posteriormente, Boulenger (1882) la menciona en su catálogo de Salientia del British Museum, y Boulenger (1887) hace referencia al acrónimo de material tipo como ZMB-6806 (Figura 1.7) y aporta nuevas características descriptivas. Ésta descripción es traducida al portugués por Miranda-Ribeiro (1926). Parker (1927), en una revisión de las especies de América del Sur, transfiere a la especie del género *Paludicola* Wagler 1830 a *Physalaemus* Fitzinger 1826. Seguramente, debido a su descripción imprecisa, su identidad específica fue un tanto controvertida. Barrio (1953) confunde a *P. henselii* con *Physalaemus barbuori* Parker 1927 (sinónimo junior de *Physalaemus fernandezae*), Barrio (1953) hace aportes de distribución, reproducción y remarca diferencias con *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867). Sus observaciones son precisas, pero en realidad se refieren a la especie *P.*

fernandezae. Esta confusión es aclarada en un trabajo posterior (Barrio, 1964).

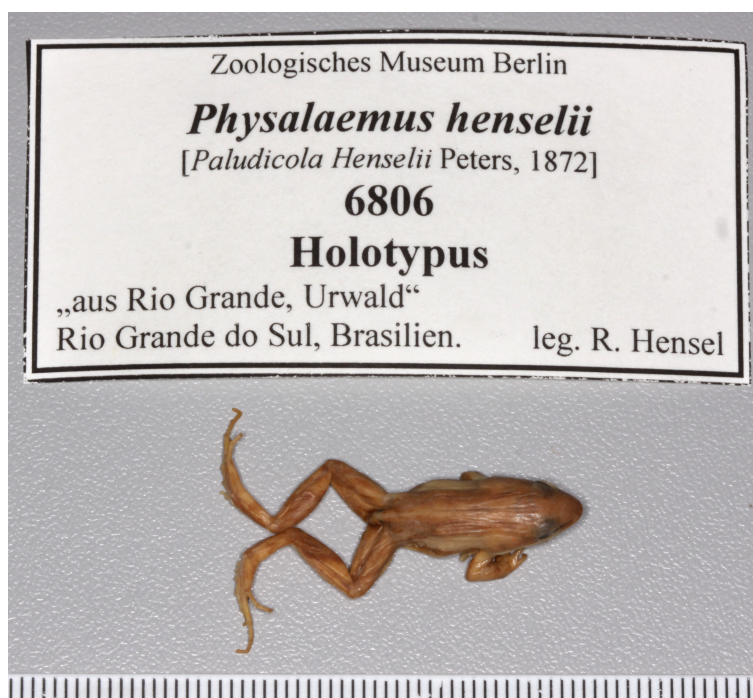


Figura 1.7: Material tipo de *Physalaemus henselii* (Peter, 1872), ejemplar ZMB-6806, depositado en el Museo de Zoología de Berlín. Cortesía de Frank Tillack y Mark-Oliver Rödel.

Una particularidad de *P. henselii* es que se reproduce durante el invierno. Barrio (1964) sugiere la existencia de dos picos reproductivos, uno más fuerte desde Junio hasta Agosto y un segundo pico en época de verano con límites no tan precisos. Maneyro et al. (2008) analizan el estado de maduración de los óvulos mediante un muestreo con trampas de caída. A diferencia de los dos picos reproductivos que reporta Barrio (1964), el estudio de Maneyro et al. (2008) muestra que las hembras grávidas sólo son encontradas en invierno. De la misma manera, en Rio Grande do Sul (Brasil) sus cantos reproductivos son reportados durante los meses de Abril hasta Julio (Santos et al., 2008). Por lo tanto el segundo periodo reproductivo quizá dependa de la población que se estudie o de condiciones climáticas propias del año.

***Physalaemus fernandezae* (Müller, 1926)**

Su distribución está casi restringida a la provincia de Buenos Aires (Barrio, 1964; Gallardo, 1965). Barrio (1964) menciona que probablemente se encuentra en el sur de Santa Fe y en la provincia de Entre Ríos. A pesar que existe material de referencia de la especie para Uruguay, en la categorización de Anfibios de Uruguay se menciona que no se ingresa

1. Introducción

material en una colección desde el año 1962 (Maneyro & Langone, 2001). Dado que existen escasos registros en la literatura, sería interesante reconfirmar las poblaciones Uruguayas y de Entre Ríos. Actualmente su distribución es considerada para Uruguay, Entre Ríos y la región costera de Buenos Aires, desde Zárate hasta Orense, ingresando hacia el interior de la provincia en la zona más sur de su distribución, hasta la localidad de D'Orbigny.



Figura 1.8: *Physalaemus fernandezae* (Müller, 1926).

En 1926 Müller describe a ésta especie en honor a la Prof. Kati Fernandez, asignándole el nombre de *Paludicola fernandezae*. Su descripción se basa en un ejemplar macho de 21 mm de longitud proveniente de Cristiano Muerto (provincia de Buenos Aires), que fue colectado por Merkle en Julio de 1921. Éste material fue depositado en el Zoologische Staatssammlung München (ZSM) (holotipo ZSM 137/1925). Glaw & Franzen (2006) revisan los materiales tipo correspondientes a anfibios que se encuentran depositados en el Museo de Munich y reportan que en el catálogo figuran 8 paratipos (ZSM 222/1925) que no son nombrados en la descripción original y por ende sería topotipos. Además, señalan que toda la serie está perdida, incluso el material tipo. Barrio (1964) nombra la existencia de un ejemplar perteneciente a esta serie que estaría depositado en el Museum of Comparative Zoology de Harvard. Efectivamente, en el catálogo online del museo (<http://mczbase.mcz.harvard.edu/SpecimenSearch.cfm>) existe un ejemplar de *Physalaemus fernandezae* (MCZ-Herpetology A-17741) que figura co-

mo paratipo y presenta los mismos datos de colecta que proporciona de Müller (Figura 1.9).



Figura 1.9: Topotipo de *Physalaemus fernandezae* (MCZ-Herpetology-A.17741) colectado junto al holotipo. Actualmente depositado en el Museum of Comparative Zoology, Harvard.

Parker (1927), advirtiendo la parafilia de los géneros *Paludicola* Wagler 1830 y *Pleurodema* Tschudi 1838, realiza una revisión donde reclasifica y diagnostica varias especies de *Physalaemus* Fitzinger 1826, *Pleurodema* Tschudi, 1838 y *Pseudopaludicola* Miranda-Ribeiro, 1926. Además, en su revisión, describe a *Physalaemus barbouri* a partir de un material proveniente de La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina. En la descripción la compara con *P. henselii*, pero aporta pocos caracteres para diferenciarla de *P. fernandezae*. Parker (1927) da referencia del holotipo de *Physalaemus barbouri* (1913.9.10.48) depositado en el British Museum, pero también menciona cinco ejemplares paratipos de los cuales no hace referencia de su numeración. Gallardo (1965), sin especificar la numeración, nombra un paratipo de *P. barbouri* depositado en el Museum of Comparative Zoology de Harvard (MCZ). En el catálogo existe un ejemplar de *Physalaemus barbouri* (MCZ- Herpetology A-12840; Figura 1.10), que en el libro de entradas figura como paratipo, pero: 1- en la descripción no dan los acrónimos del material paratipo, y por lo tanto sería un topotipo, y 2- en el libro de entradas del MCZ faltan datos como colector, fecha de colecta y las especificaciones necesarias para saber si se trata del material nombrado como paratipo por Parker (1927).

Por lo tanto, existieron tres nombres para dos especies, esto sumado a las descripciones

1. Introducción

breves y/o provenientes de ejemplares mal conservados, o la imposibilidad de examinar los materiales tipo por parte de los diferentes autores, trajo algunas confusiones. A raíz de esto, Barrio (1953), erróneamente describe aspectos biológicos de *P. henselii* en la provincia de Buenos Aires y considera que *P. barbouri* corresponde a *P. henselii* y que *P. fernandezae* es sinónimo de *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867). Es decir, describe datos biológicos atribuibles a *Physalaemus fernandezae* y *Pseudopaludicola falcipes*. Diez años después, toda ésta confusión es aclarada por el mismo Barrio (1964): 1- *Physalaemus barbouri* Parker, 1927 es sinónimo junior de *P. fernandezae* (Müller, 1926); 2- *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) es una especie válida y diferente de *P. henselii*; 3- *P. henselii* es una especie válida y diferente de *P. fernandezae* (Barrio, 1964). Por otro lado, Gallardo (1965; 1974) sigue sosteniendo la existencia de *Physalaemus barbouri* Parker en el norte de la provincia de Buenos Aires y *P. fernandezae* (Müller) para el sur de la provincia.

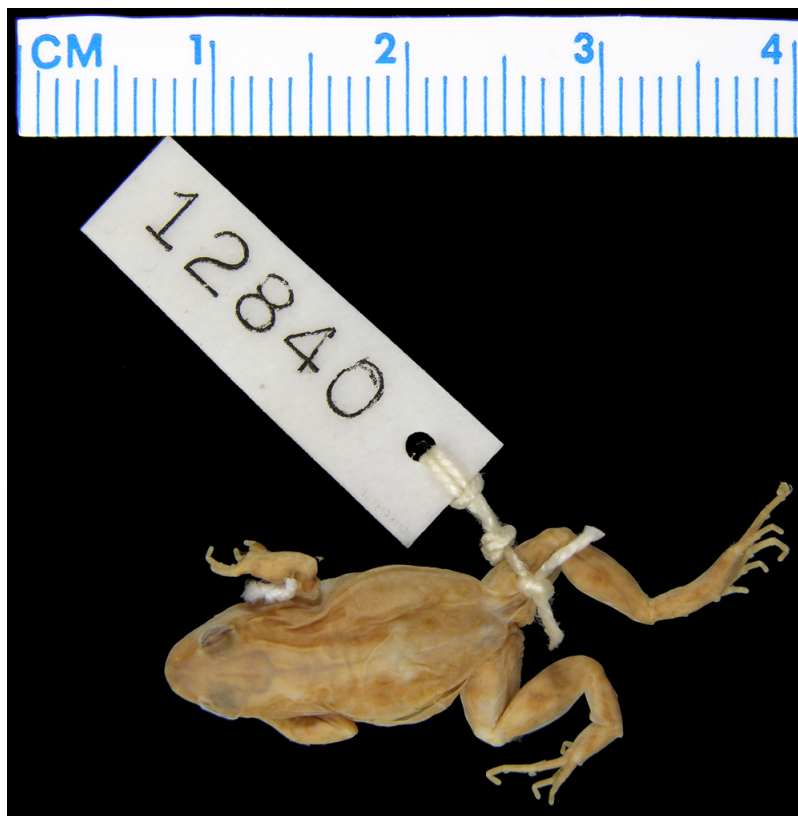


Figura 1.10: Supuesto topotipo de *Physalaemus barbouri* (MCZ-Herpetology-A.12840), actualmente depositado en el Museum of Comparative Zoology, Harvard.

Physalaemus fernandezae utiliza ambientes temporarios para su reproducción, elaborando nidos de espuma donde deposita unos 150-250 huevos no pigmentados (Barrio, 1953;1964;

Fernández, 1927; Gallardo 1965; 1974). Su canto es del tipo silbado y es la mayor diferencia que presenta con *P. henselii* (Barrio, 1964). Su vida media es de 4 años, pero hay ejemplares que llegan a los 6 años; los machos alcanzan la madurez sexual en su primer año de vida, en cambio las hembras alcanzan su madurez en el segundo año (Marangoni et al., 2012). En los trabajos realizados por Fernández & Fernández (1921) y Fernández (1927) también hay una confusión en la asignación específica. Estos trabajos relatan aspectos reproductivos y también dan características larvales, pero el dibujo del disco oral que se presenta bajo el nombre de *Pseudopaludicola falcipes* en Fernández & Fernández (1921) corresponde a *P. fernandezae*; confusamente la foto de un adulto parece pertenecer a *P. falcipes*. Fernández (1927) relata sobre los nidos de espuma de *Pseudopaludicola falcipes*, pero hoy sabemos que nidos de espuma con las características allí presentadas sólo corresponden a *P. fernandezae*. Las descripciones de los dos trabajos mencionados pueden ser comparadas con las descripciones larvales más actuales de *P. falcipes* (Laufer & Barrenche, 2008) y *P. fernandezae* (Alcalde et. al, 2006).

1. Introducción

En resumen, *Physalemus fernandezae* y *P. henselii* presentan un tamaño similar (Barrio, 1953; 1964; Maneyro et al., 2008; Marangoni et al., 2012), sus hábitos reproductivos son principalmente invernales y además, utilizan el mismo tipo de ambiente para sus posturas (Barrio, 1953; 1964; Maneyro et al., 2008; Santos et al., 2008; Marangoni et al., 2012). La gran semejanza en la morfología del adulto y también en sus larvas es sorprendente, diferenciándose sólo por características sutiles de coloración (Barrio, 1964; Alcalde et al, 2006; Kolenc et al, 2006).

El caracter más distintivo entre ambas especies es etológico: el canto nupcial de *P. fernandezae* es de tipo silbado y el de *P. henselii* es del tipo pulsado (Barrio, 1964; Maneyro et al., 2008).

“...se trata de especies afines, pero auténticas, que se reemplazan entre sí geográficamente y en las que se han hallado escasos y poco pronunciados caracteres morfológicos y ecológicos diferenciales...”

Barrio, 1964.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis de trabajo:

Los eventos de transgresiones marinas que tuvieron lugar en el Neógeno afectaron la cuenca del Plata, modificaron el paisaje y actuaron como barrera geográfica, dando como resultado un evento vicariante entre *Physalaemus fernandezae* y *P. henselii*. Los períodos glaciares-interglaciares ocurridos durante el Pleistoceno, fueron responsables de sucesivos ciclos de expansión y retracción de las poblaciones, y provocaron períodos de aislamientos (refugios) y períodos de expansiones con posibles contactos poblacionales.

• Objetivo general:

Generar información sobre la historia evolutiva de *Physalaemus fernandezae* y *P. henselii*, contribuyendo al conocimiento de los procesos biogeográficos que actuaron sobre la región pampeana.

• Objetivos específicos:

- ♣ Determinar si son, como lo sugieren otras características, especies hermanas.
- ♣ Determinar la variación genética en *Physalaemus fernandezae* y *P. henselii* abarcando sus distribuciones actuales.
- ♣ Interpretar el patrón filogeográfico de cada una de las especies en un contexto paleogeográfico, evaluando los posibles procesos que han afectado el patrón de distribución de las poblaciones de ambas especies.

CAPÍTULO 2

Materiales y Métodos

2.1. Sitios de Muestreo y Distribución

Para llevar a cabo los objetivos planteados en este trabajo debieron realizarse campañas en búsqueda de ejemplares. Previo al comienzo de las campañas, y durante el proceso de búsqueda de especímenes, las localidades de muestreo fueron seleccionadas con apoyo de material bibliográfico y revisión de colecciones herpetológicas de referencia (ver más abajo). Todas las muestras correspondientes a localidades de Argentina fueron obtenidas durante viajes de campaña diagramados específicamente para el desarrollo de este trabajo. Las muestras que pertenecen al sur de Brasil y Uruguay provinieron de colecciones biológicas y fueron complementadas con algunos viajes de campaña. Para realizar el estudio filogeográfico de cada una de las especies se seleccionaron localidades intentado representar toda la distribución geográfica de cada una de ellas; el objetivo de muestreo fue conseguir entre 7 a 10 ejemplares por cada localidad.

En los comienzos de este trabajo fueron de gran utilidad los primeros mapas de distribución geográfica de *Physalaemus fernandezae* y *P. henselii* realizados por Barrio (1964). Barrio (1967) realizó una actualización marcando el límite norte de la distribución de *P. henselii*, y posteriormente, Núñez et al. (2004) hicieron una revisión en base a material depo-

sitado en colecciones de Uruguay, reportando todas las localidades registradas de *P. henselii* y también de *P. fernandezae* (que son sólo tres localidades de los departamentos de Montevideo, Canelones y Florida), correspondientes al territorio uruguayo. A medida que se fueron revisando colecciones biológicas y reconociendo el área de distribución mediante los trabajos de campo, se hizo evidente que la distribución de *P. fernandezae* estaba subestimada en ciertas regiones y sobreestimada en otras, y que de *P. henselii* se conocían pocas referencias bibliográficas para el sur de Brasil. En la Figura 2.1 se muestra la distribución que presentó Barrio (1964), se puede observar la presencia de *P. fernandezae* en la provincia de Entre Ríos (las cercanías de Concordia) y en la zona suroeste de Uruguay, donde existe un solapamiento de las distribuciones. Los registros de *P. fernandezae* en Uruguay son confirmados por Núñez et al. (2004) basado en material de colección, pero en la categorización de “Anfibios de Uruguay” se menciona que el último hallazgo de ejemplares de *P. fernandezae* en territorio uruguayo corresponde a la década del '60 (Maneyro & Langone, 2001) .

Con la finalidad de actualizar los mapas de distribución de ambas especies y poder diseñar las campañas con mayor precisión, se revisaron las colecciones del Museo de La Plata (MLP), Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (MACN), Universidad Nacional del Nordeste (UNNEC), Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), la Colección de Vertebrados de la Facultad de Ciencias de Montevideo (ZVCB), la Colección del Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (MNHN), la Colección del Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (MCN), la colección de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) y el Museu de Ciências e Tecnologia de la Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (MCT). Del material revisado fueron excluidos 3 tipos de datos : 1- ejemplares que figuran en los libros de entrada de las colecciones, pero por diferentes razones (e.g. préstamos, pérdidas, etc) no pudieron ser verificados; 2- ejemplares de identificación dudosa y de identificación incorrecta (e.g. material en malas condiciones de preservación, juveniles erróneamente asignados); 3- ejemplares sin datos de localidad o datos muy imprecisos (e.g. provincia, país). Por otra parte, al revisar el material, fueron hallados ejemplares no registrados en los libros de entrada o que nunca fueron ingresados en las colecciones, pero que sí contaban con etiquetas que especificaban la procedencia y, por lo tanto, estos datos fueron utilizados. En el **Apéndice V** se presentan las referencias de todo el material revisado. Al material no ingresado en las colecciones se los

referencia con el acrónimo de la institución donde se encuentran depositados seguido de *sn* (sin número).

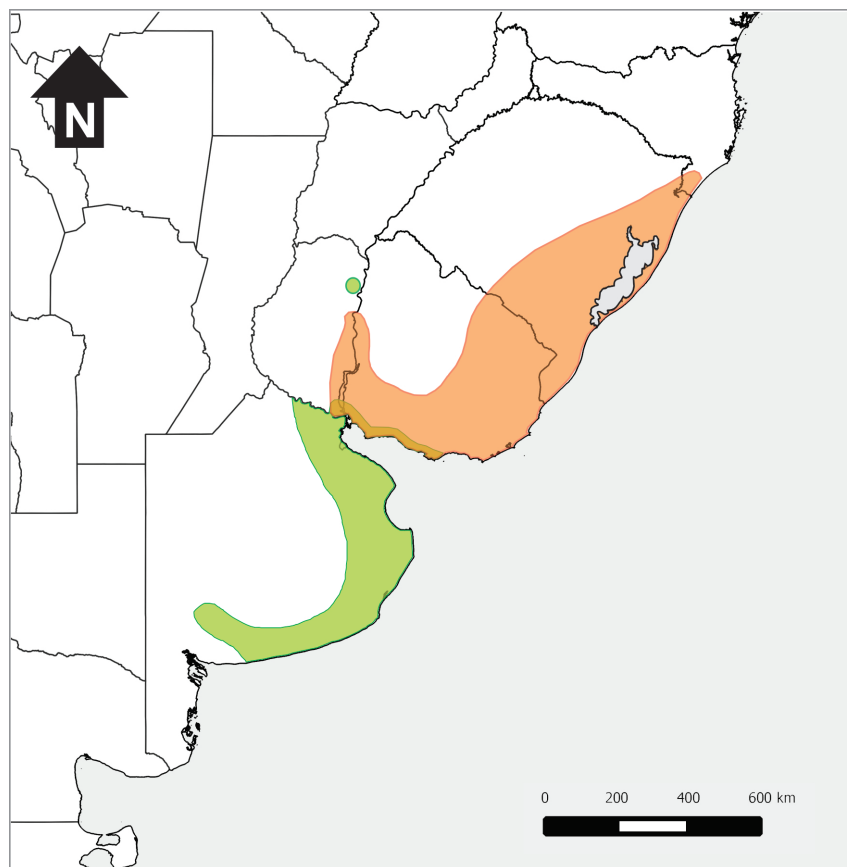


Figura 2.1: Distribución de ambas especies presentada por Barrio (1964). *Physalaemus fernandezae* en color verde y *P. henselii* en naranja. Nótese el solapamiento de las distribuciones en la región del sudoeste de Uruguay (tomado y modificado de Barrio, 1964).

Con toda la información recopilada en las colecciones y los datos obtenidos en los viajes de campaña se realizaron mapas de distribución que actualizan los mapas conocidos en la bibliografía. Para la confección de los mapas se utilizó el programa QGIS v2.0 (QGIS, 2013) y cuando los ejemplares de colección no contaban con datos de coordenadas geográficas, las localidades fueron estimadas con el programa GoogleEarth.

Este trabajo puede ser dividido en dos secciones: 1- el estudio filogeográfico para cada especie y 2- el estudio filogenético. A fin de evaluar las relaciones entre *P. fernandezae* y *P. henselii* muchas secuencias se obtuvieron del sitio GenBank, pero algunas especies como *Physalaemus fernandezae*, *P. henselii*, *P. santafecinus* y *P. cuqui* fueron colectadas y secuenciadas específicamente para el presente trabajo. Todos los ejemplares utilizados fueron

tratados de la misma manera que lo descripto a continuación.

2.1.1. Colecta y preservación de especímenes

La captura de ejemplares se realizó mediante búsqueda activa durante la época reproductiva, que para estas especies es durante el invierno (Barrio, 1964; Gallardo, 1965; Maneyro et al., 2008; Santos et al., 2008). En actividad reproductiva los machos emiten su canto nupcial y esto facilita su localización, de este modo se identificaron los puntos de colecta. Además de ejemplares adultos, se colectaron de forma parcial o total nidos de espuma, estructuras que contienen huevos y/o embriones pertenecientes a una hembra. De cada nido se asumió que todos los renacuajos eclosionados comparten el mismo ADN mitocondrial (ADNmt) que la hembra progenitora y, es por ello, que todos los renacuajos obtenidos de un mismo nido de espuma fueron considerados como una única muestra.

Una vez colectados los ejemplares adultos, dependiendo de la duración de la campaña, se los procesó en el campo o en laboratorio, se sacrificaron con benzocaína en gel al 25 % o también en solución alcohólica diluida (10 %). Posteriormente se realizó una disección a fin de obtener un fragmento de músculo, una falange o un fragmento de hígado. El tejido obtenido se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml con alcohol etílico 96 %, que fue renovado a las 24-48 Hs y preservado a -20 °C hasta su procesamiento. Después de obtener la muestra de tejido, los ejemplares fueron fijados con formol 10 % y conservados en alcohol etílico al 70 %.

Los nidos de espuma fueron transportados al laboratorio, en donde se colocaron en bateas independientes con agua desclorinada. Todas las larvas eclosionadas fueron criadas hasta que llegaron a un volumen corporal que facilitara la extracción de ADN, en ese momento se sacrificaron en una solución alcohólica muy diluida (alcohol etílico 5 %). Una parte de cada cohorte fue conservada en alcohol 96 % (con 3-4 recambios del alcohol) y mantenidas a -20°C, y la otra parte de la muestra fue fijada y conservada en formol al 10 % con la finalidad de preservar ejemplares de referencia.

La identificación de los adultos de ambas especies fue realizada siguiendo las descripciones de Barrio (1964), en cuanto a las larvas se usaron los trabajos de Alcalde et al. (2006) para *P. fernandezae* y Kolenc et al. (2006) para *P. henselii*.

2.2. Procedimientos de laboratorio

2.2.1. Extracción de ADN

La obtención del ADN genómico a partir de muestras de tejido se llevó a cabo utilizando, de manera indistinta, el método de fenol-cloroformo (Sambrook et al. 1989) o una modificación del método de extracción salina propuesto por Aljanabi & Martinez (1997) (ver detalles en Tabla: 2.1).

Una vez obtenido el ADN, la calidad y cantidad de la extracción fue chequeada en una corrida de electroforesis. Para ello se sembraron 2 μ l de cada muestra más 1 μ l de buffer de carga en cada calle de un gel de agarosa 1 % (en buffer TBE o TAE). En cada gel se sembró un marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) como referencia de tamaño y concentración (ver Figura 2.2). Para evitar que las muestras se difundan, se las corrió a 100 mv durante unos minutos y luego a 80 mv durante aproximadamente una hora. En los casos que la muestra presentó un chorreado (*smear*), se la incubó 2 hs a 37 °C con ARNasa para eliminar todo el ARN degradado y se realizó una nueva cuantificación. Cuando la cantidad de ADN extraído dificultó su cuantificación debido al intenso brillo, se realizaron diluciones en agua y se volvió a sembrar.

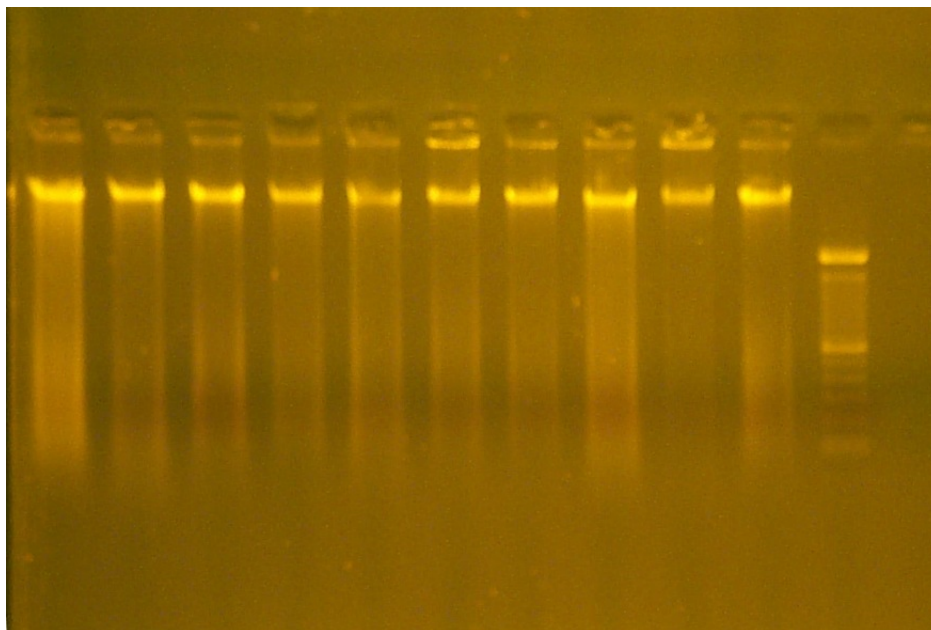


Figura 2.2: Extracción de ADN a partir de músculo, en la calle 11 se puede observar el marcador de tamaño molecular con una banda de ~2072 pb y otra de ~500 pb.

Método de Fenol-Cloroformo	Método de extracción salina
1- Colocar un pequeño fragmento de tejido en un eppendof de 1,5 ml.	1- Colocar un pequeño fragmento de tejido en un eppendof de 1,5 ml.
2- Agregar 250 μ l de buffer de lisis + 20 μ l de proteinasa K (1 mg/ml).	2- Agregar 250 μ l de buffer de lisis + 20 μ l de proteinasa K (1 mg/ml).
3- Incubar a 55 °C durante aproximadamente 3 Hs.	3- Incubar a 55 °C durante aproximadamente 3 Hs.
4- Agregar 400 μ l de fenol y 400 μ l de cloroformo-isoamílico.	4- Centrifugar 15 min a 13000 rpm.
5- Mezclar suavemente.	5- Pipetear 230 μ l y poner en nuevo eppendof.
6- Centrifugar 15 min a 13000 rpm.	6- Agregar 150 μ l de ClNa (5M), agitar un poco y centrifugar a 15 min a 13000 rpm.
7- Pipetear sobrenadante (~400 μ l) y poner en nuevo eppendof.	7 - Pipetear sobrenadante (340 μ l) y poner en nuevo eppendof.
8- Agregar el doble (~800 μ l) de etanol absoluto frío.	8- Agregar el doble (640 μ l) de etanol absoluto frío.
9- Centrifugar 15 min a 13000 rpm.	9- Centrifugar 15 min a 13000 rpm.
10- Quitar el alcohol, secar a 37°C.	10- Quitar el alcohol, secar a 37°C.
11- Resuspender con 50 μ l de buffer TE.	11- Resuspender con 50 μ l de buffer TE.
12- Conservar a 4 °C durante 12 Hs.	12 - Conservar a 4 °C durante 12 Hs.

Tabla 2.1: Métodos utilizados para realizar las extracciones de ADN. Para ver la preparación de las soluciones ver **Apéndice VI**.

2.2.2. Amplificación y secuenciación

A partir del ADN extraído, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fueron amplificados dos marcadores moleculares de ADN mitocondrial: los fragmentos del gen Citocromo b (*Cyt-b*) y de la Región Control (*D-loop*) fueron amplificados para todas las muestras. Ambos marcadores se utilizaron para el estudio de genética poblacional y filogeográfico. Para el estudio filogenético se utilizaron fragmentos de los genes *12S*, *tRNA^{Val}* y *16S*. Gran parte de estos genes fueron bajados del sitio *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ejemplares pertenecientes a *Physalaemus fernandezae*, *P. henselii* y otras especies relacionadas fueron amplificados y secuenciados para este trabajo. En la Tabla 2.2 se especifican los cebadores utilizados para los distintos genes o fragmentos.

El volumen total para las reacciones de PCR fue de 25 μ l, compuesto por 1 μ l de muestra con una concentración aproximada de 10 ng/ μ l, 1 μ l de cada cebador (1 μ M), 17,5 μ l de H₂O, 2,5 μ l de buffer (10x), 1,5 μ l de ClMg₂ (50 nM), 0,5 μ l de dNTPs (50 nM) y 0,25 μ l de Taq polimerasa. El ciclado consistió de 3 de fases: la primera de 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, la segunda de amplificación con 40 ciclos [30 segundos a 94°C de desnaturalización; 45 segundos con una temperatura entre 45-50 °C de asociación dependiendo de los cebadores usados; 2 minutos a 72°C de extensión] y una última fase de extensión final de 6 minutos a 72°C. El control de las amplificaciones se realizó con corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1 % en TAE 1x o TBE 0,5x. Posteriormente los geles fueron teñidos en solución de Bromuro de Etidio 1 % y visualizados en un transluminador UV (Figura 2.3).

Los productos de PCR se purificaron con el Kit GeneClean III (MP Bio-medicals) o con el sistema de vacío Millipore Montage 96-Well. Posteriormente se cuantificó la concentración del producto de purificación mediante su visualización en un gel de agarosa 1 %. La reacción de secuenciación fue realizada en placas de 96 celdas usando el protocolo estándar de Big Dye Termini-

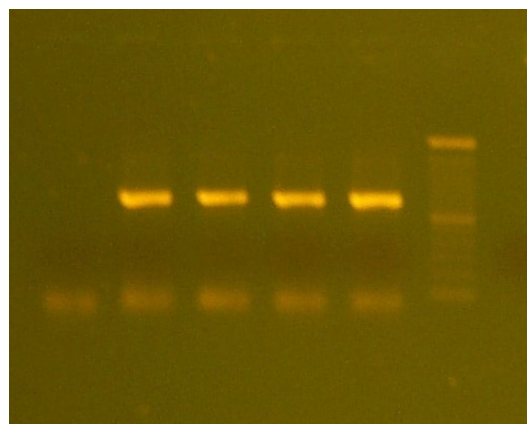


Figura 2.3: Fragmento amplificado de ~800 pb, en la calle 6 se puede observar el *ladder* con una banda de ~2072 pb y otra de ~500 pb.

nator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc.) y la secuencia de cada fragmento de ADN fue obtenida en un Analizador Genético ABI 3130 (Applied Biosystems, Inc.) en el laboratorio de Biología Molecular del CENPAT .

Primer	Gen	Secuencia (5' → 3')	Fuente
MVZ-15	Cyt-b	GAA CTA ATG GCC CAC ACW WTA CGN AA	Moritz et al.,1992
MVZ-16	Cyt-b	AAA TAG GAA RTA TCA YTC TGG TTT RAT	Moritz et al.,1992
C-Wrev-L	D-loop	GAC ATA YTA TGT ATA ATC GAG CAT TCA	Goebel et al.,1999
CPH	D-loop	GTC CAT AGA TTC AST TCC GTC AG	Goebel et al.,1999
MVZ59-F	<i>12S-tRNA^{Val}-16S</i>	ATA GCA CTG AAA AYG CTD AGA TG	Graybeal, 1977
tRNA Val-R	<i>12S-tRNA^{Val}-16S</i>	GGT GTA AGC GAR AGG CTT TKG TTA AG	Goebel et al.,1999
12SM-F	<i>12S-tRNA^{Val}-16S</i>	GGC AAG TCG TAA CAT GGT AAG	Darst & Cannatella, 2004
16SAH-R	<i>12S-tRNA^{Val}-16S</i>	ATG TTT TTG GTA AAC AGG CG	Goebel et al., 1999 (N°84)
16SC-F	<i>12S-tRNA^{Val}-16S</i>	GTR GGC CTA AAA GCA GCC AC	Darst & Cannatella, 2004
16SD-R	<i>12S-tRNA^{Val}-16S</i>	CTC CGG TCT GAA CTC AGA ATC ACG TAG	Darst & Cannatella, 2004
12L1-F	<i>12S-tRNA^{Val}-16S</i>	AAA AAG CTT CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT	Goebel et al., 1999 (N°46)
16SH-R	<i>12S-tRNA^{Val}-16S</i>	GCT AGA CCA TKA TGC AAA AGG TA	Goebel et al., 1999 (N°76)

Tabla 2.2: Cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación de fragmentos de los genes *Cyt-b*, *D-loop*, *12S*, *tRNA^{Val}* y *16S*.

2.3. Análisis interespecífico

Una de las hipótesis de este trabajo es que *Physalaemus fernandezae* y *P. henselii* son especies hermanas. Existen estudios que, sin usar herramientas filogenéticas, sugieren que estas dos formas son muy próximas. Para ello se basan en características de morfología externa, osteología, etología, proximidad biogeográfica, semejanza larval y caracteres del desarrollo (Barrio, 1964, 1965; Lobo, 1996; Nascimento et al., 2005; Alcalde et al., 2006; Kolenc et al., 2006; Vera Candiotti et al., 2011). Para poner a prueba esta hipótesis, se realizó un análisis filogenético utilizando caracteres moleculares. El género *Physalaemus* cuenta con 45 especies, de las cuales aproximadamente el 75 % se distribuyen en Brasil. Esto es una limitante para evaluar una hipótesis filogenética incluyendo todos los representantes del género y, por

lo tanto, el análisis está limitado a las especies con información disponible. De la búsqueda exhaustiva en el sitio GenBank fueron obtenidas secuencias de los genes *12S*, *tRNA^{Val}* y *16S* (ADNmt) pertenecientes a 15 especies de *Physalaemus*. Además de las secuencias tomadas de GenBank, se generaron secuencias de *Physalaemus cuqui*, una secuencia de *P. santafecinus*, tres secuencias de *P. fernandezae*, tres de *P. henselii* y dos especies del género *Pseudopaludicola*.

Con las secuencias generadas por este estudio y las obtenidas de GenBank se suma un total de 18 especies pertenecientes al género *Physalaemus*. Los grupos externos fueron seleccionados en base a las hipótesis filogenéticas de Correa et al. (2006), Frost et al. (2006), Grant et al. (2006), Pyron & Wiens (2011), Faivovich et al. (2012) y Fouquet et al. (2013). Para algunas especies se seleccionaron varios ejemplares siguiendo los trabajos de Weigt et al. (2005), Ron et al. (2006) y Funk et al. (2007). Debido a que las tasas de mutación para las especies estudiadas son desconocidas, para poder estimar los tiempos de divergencia se tuvo que realizar un amplio muestreo de especies no pertenecientes al género (ver sección 2.3.2).

Para el análisis se utilizaron 72 terminales donde se incluyen representantes de las familias Leptadactylidae, Odontophrynidae, Alsodidae, Hylodidae, Ceratophryidae, Telmatobiidae y un representante de Hylidae utilizado para enraizar los árboles. Los números de acceso a GenBank y referencias de los terminales utilizados se presentan en el **Apéndice I**.

2.3.1. Alineamiento de secuencias

Los genes *12S*, *tRNA^{Val}* y *16S* se encuentran de manera contigua en el ADN mitocondrial. En este trabajo se utiliza un fragmento del gen *12S*, el *tRNA^{Val}* completo y un fragmento del gen *16S*, que sumados dan una longitud de ~2250 pb. Mediante los protocolos estándares, un fragmento de éste tamaño no puede ser amplificado y secuenciado en una sola reacción. Para su obtención se amplificaron y secuenciaron las dos hebras de cuatro fragmentos que superponen sus extremos (ver Tabla 2.2) y luego fueron ensamblados. La edición de las secuencias se realizó con el programa DNASTar Lasergene SeqMan v7.1.0. que permite, de manera simultánea, superponer las dos hebras del mismo fragmento y solapar los extremos de fragmentos contiguos. A continuación de editar los cuatro fragmentos solapados se guarda una “secuencia consenso” correspondiente a la suma de todos ellos. Después de editar y ensamblar los cromatogramas cada secuencia fue verificada con la herramienta “*The Basic Local Alignment*

Search Tool” (BLAST), disponible online en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Las 72 secuencias utilizadas para el análisis filogenético fueron sumadas en un archivo y posteriormente alineadas. Para su alineamiento fueron utilizados diferentes métodos que a posterior se evaluaron bajo el criterio de parsimonia. La matriz fue alineada con Clustal-X (Thomson et al., 1997) con las opciones por defecto; distintas estrategias disponibles en el programa MAFFT v7 (Kato & Standley, 2013) (FFT-NS-i; L-INS-i; G-INS-i y Q-INS-i) y utilizando el programa Muscle (Edgar, 2004) con opciones por defecto.

Las secuencias utilizadas presentaron amplia variación en su longitud, con un rango entre 1461 y 2449 pb (ver **Apéndice I**). Cuando son alineadas secuencias con diferentes longitudes, con la finalidad de igualar la cantidad de caracteres, los programas codifican los extremos de las secuencias más cortas de la misma manera que los gaps. Para eliminar estos “falsos gaps externos”, en todas las matrices fueron codificados como entradas faltantes (missing=?). Después de examinar los alineamientos, se observó que en algunas terminales la primera y/o segunda base se desplazó muy distante del resto de la secuencia. Éstos “errores” del alineamiento provocan gran cantidad de gaps para esa terminal y por este motivo las bases conflictivas fueron removidas.

Para evaluar los alineamientos se consideró que el alineamiento que recupera el o los árboles más cortos, bajo el criterio de parsimonia, es el óptimo. Con este fin, para cada alineamiento se realizó una búsqueda heurística con el programa TNT v.1.1 (Goloboff et al., 2008). Las búsquedas consistieron en 100 réplicas de secuencias de adición al azar y TBR (*tree-bisection-reconnection branch swapping*), guardando 15 árboles por réplica. Por cada matriz se corrió el análisis 2 veces, en la primera los gaps fueron considerados como 5^{to} estado y en la segunda como entradas faltantes. De cada análisis se anotó su longitud y la cantidad de árboles obtenidos. También se realizó un consenso estricto y se exploró la topología del árbol (ver Tabla 3.1).

2.3.2. Análisis filogenético

Máxima parsimonia

La metodología de búsqueda fue la misma que se utilizó para evaluar los alineamientos. La matriz utilizada aquí y en la aproximación bayesiana fue aquella que, considerando los gaps como 5^{to} estado, dió los árboles más cortos después de las pruebas realizadas con las

diferentes estrategias de alineamiento. Con los árboles obtenidos en el análisis se realizó un consenso estricto. Los soportes de los nodos se pusieron a prueba mediante 1.000 réplicas de *jackknife* con frecuencias absolutas removiendo el 36 % de la matriz (Farris et al., 1996). Todo el procedimiento fue realizado utilizando el programa TNT. Para editar los árboles se utilizaron los programas FigTree v 1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) y Corel-Draw. Además del árbol obtenido que se presenta en el apartado resultados, en el Apéndice II se muestran los consensos estrictos de los árboles generados con los alineamientos Q-INS-i, L-INS-i y G-INS-i considerando los gaps como 5^{to} estado y el obtenidos con el alineamiento Q-INS-i con los gaps como entradas faltantes.

Inferencia bayesiana

A diferencia de los análisis de máxima parsimonia, los métodos probabilísticos requieren la incorporación de un modelo de sustitución nucleotídica. Existen varios programas diseñados para buscar el modelo “adecuado” o que más se ajusta a los datos, y además distintos métodos de búsqueda del modelo. En este trabajo se utiliza el programa jModelTest 2 (Posada, 2008), bajo el Criterio de Información de Akaike con corrección (AICc) (Akaike, 1974; Posada & Crandall, 2001a) contemplando 88 modelos posibles. Las búsquedas del modelo de evolución molecular y el análisis bayesiano se realizaron con la matriz generada bajo el alineamiento “más parsimonioso” sin contemplar particiones.

Para la aproximación bayesiana se utilizó el paquete de reconstrucción genealógica BEAST v1.7 (Drummond et al., 2012). El análisis se corrió asumiendo un *Yule Process* como probabilidad previa del árbol, con 30.000.000 interacciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), muestreando los parámetros cada 3000 interacciones, descartando el primer 20 % como *burn-in*. El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue el *modelo general reversible en el tiempo* (Tavaré, 1986) con distribución gamma y sitios invariables (GTR+G+I).

El programa BEAST permite obtener el árbol de relaciones filogenéticas con la opción de estimar, de manera simultánea, los tiempos de divergencia utilizando un reloj molecular relajado (Drummond et al., 2006). Para testear la hipótesis que las especies aquí estudiadas son hermanas y que divergieron a causa de las transgresiones marinas del Mioceno, con las mismas condiciones descritas anteriormente, se realizaron pruebas independientes donde son datados diferentes nodos:

Prueba 1: El género *Engystomops* está cercanamente relacionado a *Physalaemus* y por ello en esta prueba se data un nodo interno de *Engystomops pustulosus*. Aquí se utiliza información presentada en los trabajos de Weigt et al. (2005) y de Ron et al. (2006), pero con una modificación. En el primer trabajo utilizan secuencias del gen CO1 (ADNmt) de *E. pustulosus*, allí en base a ejemplares provenientes del norte y del sur del Istmo de Panamá, muestran que el grupo del norte es monofilético y que su pasaje hacia el norte fue previo a formación del istmo, hace ~3 Ma. En el trabajo de Ron et al. (2006) utilizan, aproximadamente, las mismas poblaciones que Weigt et al. (2005), pero con los genes *12S-tRNA^{Val}-16S*. Esto permite combinar las interpretaciones de Weigt et al. (2005) con los genes aportados por Ron et al. (2006). La modificación que se realiza en este trabajo es el nodo a calibrar. El cambio se debe a que si el grupo del norte del istmo es monofilético, esto implica que el pasaje se dio una sola vez y en dirección norte. Por lo tanto, aquí se considera que la datación en ~3 Ma debe ser ubicada en el nodo basal del grupo norte y no en la base de *E. pustulosus*. De esta forma la calibración que Weigt et al. (2005) utilizaron para el nodo basal de toda la especie ($2,95 \pm 0,15$ Ma), es llevada al nodo basal de los *E. pustulosus* del norte, en el árbol presentado en resultados se enumeran como *E. pustulosus* del 10 al 15. Para la calibración se utilizó una distribución normal con una media de 2,95 Ma y un desvío de 0,15 Ma.

Prueba 2: Se utiliza la propuesta de Fouquet et al. (2013) para calibrar el nodo basal a los géneros *Engystomops*, *Physalaemus* y *Pleurodema*. Para ello se asume una distribución normal, con una edad media de 50,45 Ma y un desvío estándar de 8,23 Ma.

Prueba 3: También se utiliza la propuesta de Fouquet et al. (2013) buscando datar un nodo más lejano al grupo de estudio. En este caso se calibra el nodo que relaciona a los géneros *Adenomera* y *Leptodactylus*. Para ello se asume una distribución normal, con una edad media de 53,63 Ma y un desvío estándar de 6,72 Ma.

Prueba 4: Se calibra el nodo que une a *Pleurodema* y *Leptodactylus*. Esta edad es obtenida del trabajo de Zhang et al. (2013). En el trabajo no se especifican con precisión las edades de los nodos ni tampoco sus desvíos. Para esta prueba se estima la edad del nodo en base al gráfico y se da una amplia desviación (media= 60 Ma; sd=10 Ma).

En todos los casos la estacionalidad de las cadenas (MCMC) y el tamaño muestral efec-

tivo (EES) de los parámetros fueron visualizados con el programa Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond, 2009), auxiliar del paquete BEAST. Posteriormente, se obtuvo el árbol consenso de todos los obtenidos por el análisis descartando el primer 20 % de los árboles como *burn-in* con el programa TreeAnnotator v 1.7 (Drummond et al., 2012). De esta manera se obtuvo la edad media, el desvío y las medidas de soporte (*probabilidades posteriores*) para cada nodo del árbol. La edición de los árboles fue realizada con los programas FigTree y CorelDraw.

Estimación de la tasa de mutación

Para estimar la tasa de mutación de ambas especies, primero se alinearon todos los haplotipos concatenados utilizando el programa Clustal-X con sus condiciones por defecto, y luego, fueron eliminadas las regiones donde se generaron gaps por diferencias de tamaño entre los fragmentos de una u otra especie. A fin de obtener las tasas de mutación total y de cada gen por separado, la matriz concatenada fue dividida en una de *Cyt-b* y otra de *D-loop*. Para cada set de datos se buscó el modelo de evolución molecular bajo el Criterio de Información Akaike con corrección (AICc) utilizando el programa JmodelTest2. En cada una de las tres matrices se corrió un análisis coalescente donde se asumió un modelo poblacional de tamaño constante y un reloj lognormal relajado. Para poder hacer una comparación se utilizaron dos puntos de calibración, estos análisis se realizaron considerando que las transgresiones marinas, denominadas “Mar Paranaense”, presentaron 2 pulsos: el primero de ellos data entre 15-13 Ma y uno segundo pulso entre 10-5? Ma (Hernández et al., 2005). Pero según los autores en las zonas costeras, como en la provincia de Buenos Aires, el mar permaneció el período completo desde ~15 hasta los ~5 Ma. Por lo tanto, para estimar la tasa de mutación se realizó una primer prueba considerando al nodo basal entre ambas especies con una edad de 14 ± 1 Ma, momento en que ingresó el mar, y una segunda prueba llevando el punto de calibración a 5 ± 1 Ma de años, momento en que se retiró el mar.

Todos los análisis se corrieron en BEAST 1.7 con 25.000.000 de interacciones de las cadenas de MCMC, que fueron muestreadas cada 5000 interacciones. Los parámetros de la corrida fueron visualizados con Tracer v1.5 y de allí se tomó el valor de la tasa de mutación y sus desvíos.

2.4. Análisis intraespecíficos: *métodos generales*

En esta sección serán presentados los métodos utilizados para realizar el estudio filogeográfico de cada especie. Se detalla cómo fue aplicado cada método y que programa fue utilizado para su realización. Los resultados del estudio filogeográfico de cada una de las especies son presentados de manera separada. En el caso particular que en alguna de las especies se haya realizado alguna modificación a la metodología general, ésta será aclarada en la sección de resultados de la misma.

2.4.1. Edición y alineamiento de secuencias

Las secuencias correspondientes a cada ejemplar fueron alineadas usando el programa Clustal-X (Thomson et al., 1997) con las opciones por defecto implementado en el programa BioEdit (Hall, 1999). Después de alinear los fragmentos (*Cyt-b* y *D-loop*) por separado, cada alineamiento fue recortado al tamaño de secuencia más pequeña. Las secuencias pertenecientes al mismo individuo fueron unidas o *concatenadas* utilizando el programa Mesquite v2.75 (Maddison & Maddison, 2011).

De esta manera se obtuvieron seis matrices: una de *Cyt-b* para *P. fernandezae* y otra para *P. henselii*, una de *D-loop* por cada especie y una con la suma de *Cyt-b+D-loop* para cada especie. En las secciones descriptivas se analizan cada uno de los genes por separado y ambos genes concatenados, y en las secciones siguientes, estructura poblacional e historia demográfica, siempre serán utilizadas las matrices con los genes concatenados.

2.4.2. Diversidad genética

A fines descriptivos se calcularon diferentes índices de variación molecular. Para cada población muestreada y para cada especie en su conjunto se examinó el número de haplotipos (k), la diversidad haplotípica (Hd), el número de sitios polimórficos (sitios informativos y no informativos) y la diversidad nucleotídica (π). Para su cálculo se utilizó el programa DnaSp v5.1 (Librado & Rozas, 2009). Dado que cada gen puede tener características propias, en esta sección la diversidad molecular será descripta para cada gen por separado (*Cyt-b* y *D-loop*) y, posteriormente, para ambos genes concatenados. Como se mencionó anteriormente, el resto de los análisis serán realizados con las matrices que contienen ambos genes concatenados.

2.4.3. Estructura poblacional

Árbol de genes

Este análisis se realizó con los haplotipos identificados en la matriz concatenada. Los árboles se obtuvieron mediante una aproximación bayesiana utilizando el total de haplotipos obtenidos para cada especie. Como paso previo al análisis, para cada especie se calculó el modelo de sustitución nucleotídica más óptimo para el set de datos mediante el programa jModeltest 2 (Posada, 2008). Se evaluaron los 88 modelos posibles mediante el Criterio de Información Akaike con corrección (AICc), que propone modelos más precisos y simples que el AIC (Akaike, 1974) dado que penaliza la adición de parámetros adicionales (Posada & Crandall, 2001a). El análisis fue realizado con el paquete de reconstrucción genealógica BEAST v1.7 (Drummond et al., 2012). Se contemplaron 4 categorías discretas de sustitución nucleotídica y el parámetro de distribución gamma fue estimado por el programa. Se llevó a cabo un análisis coalescente donde se asumió un modelo poblacional de tamaño constante. La corrida fue de 15.000.000 de interacciones de las cadenas de Markov de Monte Carlo muestreando todos los parámetros cada 1000 interacciones.

La estacionalidad de la cadena de MCMC y el tamaño muestral efectivo para cada parámetro (EES) fueron visualizados con el programa Tracer v1.5. Con el programa TreeAnnotator v 1.7 se obtuvo el árbol consenso de todos los obtenidos por el análisis, el primer 20 % de los árboles fue descartado como *burn-in*. Las medidas de soporte para cada linaje son expresadas como *probabilidad posterior*, ésta medida representa la frecuencia con que fue encontrado cada uno de los nodos. La edición de los árboles fue realizada con los programas FigTree y CorelDraw.

Considerando la distribución de cada linaje obtenido en la aproximación bayesiana, se construyó un mapa que permite visualizar cómo se distribuyen los linajes entre las poblaciones muestreadas. Para ello fue utilizada la herramienta *online* PhyloGeoViz (Tsai, 2011), esta permite hacer gráficos de tortas en cada población y de esta manera mostrar que proporción de haplotipos de cada población corresponden al grupo asignado, en este caso los linajes. Los gráficos obtenidos se editaron con los programas GoogleEarth y CorelDraw.

Redes de haplotipos

Una forma de representar las relaciones entre los haplotipos es por medio de redes de haplotipos o *networks*. Posada & Crandall (2001b) argumentan que las redes son gráficos más apropiados que los árboles filogenéticos para representar las relaciones entre los haplotipos que componen una misma especie. Esto se debe a que las genealogías intraespecíficas no siempre disponen de jerarquía y muchos supuestos de los árboles filogenéticos no se cumplen (e.g. árboles totalmente dicotómicos). Por ejemplo, en las redes es muy común encontrar coexistiendo haplotipos ancestrales y su o sus derivados, mientras que en las relaciones filogenéticas el ancestro común entre dos terminales es siempre una entidad hipotética. Las redes de haplotipos para cada especie se construyeron con el programa Network 4.1 (<http://www.fluxustechology.com>), en ambas especies fue utilizada la matriz con los genes concatenados donde los gaps fueron considerados como 5^{to} estado. El criterio utilizado fue el *Median-Joining Networks* (Bandelt et al., 1999) y un análisis posterior de *máxima parsimonia*. Para la edición gráfica de las redes se utilizó el programa CorelDraw.

Análisis de la Varianza Molecular

La estructura genética de cada especie fue examinada mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA). Este análisis utiliza información de las secuencias de ADN para testear si existen diferencias entre grupos definidos *a priori* (Excoffier et al., 1992). La varianza total de la muestra es descompuesta en porcentaje de variación entre los grupos previamente definidos, dentro de estos grupos y entre individuos de las poblaciones. La significancia de los índices de fijación se realiza mediante una prueba no paramétrica, donde se permutan haplotipos, individuos y poblaciones, y luego de cada serie de permutación se vuelven a calcular los valores y se comparan los estadísticos (Excoffier et al., 1992). El nivel de significancia utilizado en todos los análisis fue de $p < 0,01$.

Previamente a realizar las pruebas de AMOVA, para poder distinguir diferencias y/o similitudes entre las poblaciones, se obtuvieron las tablas de *Fst* pareados para cada una de las especies. Los criterios utilizados para generar los grupos dentro de cada una de las especies, serán explicados en la sección de los resultados. Los análisis se realizaron con el programa ARLEQUIN versión 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010); la significancia de los estadísticos fue obtenida mediante 1000 permutaciones y las distancias utilizadas entre las secuencias fue la

de Tamura–Nei (Tamura & Nei, 1993).

Aislamiento por distancia

La prueba de Mantel (Mantel, 1967) es de gran utilidad para cuantificar que grado de correlación existe entre dos matrices. Aquí es utilizada para evaluar si existe una correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas de las poblaciones. Como distancias genéticas entre las poblaciones fue considerado el valor de F_{st} , obtenido con el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) mediante el uso de distancias de Tamura–Nei (Tamura & Nei, 1993). La segunda matriz se realizó utilizando las diferencias pareadas de las distancias geográficas entre las poblaciones. Para ello se utilizó la herramienta de medición del programa Q-GIS 2.0. Comúnmente en la literatura se observa que la prueba de Mantel es realizada midiendo las distancias geográficas en línea recta, pero en realidad se pueden presentar diferentes criterios de cómo medir y de esta manera generar hipótesis alternativas (e.g. Cardoso & Montoya-Burgos, 2009). Para *Physalaemus henselii* las distancias geográficas fueron tomadas en línea recta y de una manera alternativa, como se especifica en los resultados. En cambio, para *P. fernandezae* la única alternativa fue medir en línea recta. El análisis fue realizado en Excel con el complemento Pop Tool V3.1 (Hood, 2009), la significancia fue obtenida mediante 1000 permutaciones.

2.4.4. Historia demográfica

Cuando se estudian procesos microevolutivos o relaciones por debajo del nivel de especie, la historia demográfica puede tener gran impacto sobre la estructura genealógica (ver Avise, 2000), y por lo tanto, la reconstrucción de esta historia nos permite obtener información útil para interpretar diversos procesos de evolución (Ho & Shapiro, 2011). Existe una variedad de métodos disponibles para estimar patrones demográficos usando datos de secuencias de ADN. Ramos-Onsins & Rozas (2002) hacen una comparación de los estadísticos más utilizados y los clasifican en 3 clases dependiendo de la información que utiliza cada uno de ellos. Adicionalmente a los estadísticos, existen otros análisis como el skyline-plot bayesiano (Drummond et al., 2005), que son muy útiles para explorar los cambios en el tamaño efectivo poblacional (N_e) a través del tiempo.

Recientemente, fue desarrollado un análisis bajo el nombre de *filogeografía bayesiana*

que apunta a reconstruir cambios demográficos en el rango de distribución. Éste análisis busca identificar el centro de origen y las rutas de dispersión en espacio y tiempo (Lemey et al., 2009; 2010). Para explorar la historia demográfica de cada especie, se utilizó al menos un estadístico de cada una de las tres clases propuestas por Ramos-Onsins & Rozas (2002), y también se realizaron análisis bayesianos (skyline-plot y filogeografía bayesiana) como se describe a continuación:

Pruebas estadísticas

Estadísticos de clase I. Estas estimaciones se basan en los sitios segregantes, utilizan parámetros poblacionales y contrastan los datos con lo esperado bajo la teoría neutral (Kimura, 1968; 1986). En esta clase se incluyen las pruebas D de Tajima (Tajima, 1989) y el R_2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). La primera de ellas utiliza los parámetros poblacionales θ y π , que hacen referencia al número de sitios segregantes y la diversidad nucleotídica. La lógica es que grandes muestras con poca diversidad nucleotídica (π) está indicando que los haplotipos se relacionan entre ellos por unos pocos pasos mutacionales, lo que se ve reflejado en una topología en estrella que indica una reciente expansión demográfica. La prueba R_2 se basa en la cantidad de mutaciones simples (*singletons*) que existen en relación al promedio de diferencias nucleotídicas de la muestra. Por lo tanto, distingue que cantidad de las diferencias observadas en la muestra se debe a mutaciones simples. Ambas pruebas son realizadas con el programa DNAsp v5 y su significancia fue calculada al 95 % de confianza, en base a 1000 simulaciones coalescentes (Hudson, 1990).

Estadísticos de clase II. Estos se basan en la distribución de haplotipos. De esta clase fue utilizada la prueba F_s de Fu (Fu, 1997), este estadístico utiliza el parámetro poblacional θ para generar una distribución esperada bajo neutralidad, y de esta manera, evalúa la probabilidad de encontrar un número mayor o menor de haplotipos esperados que el número observado en una muestra. Valores bajos de F_s se corresponden con un exceso de mutaciones simples causado por un evento de expansión. Este estadístico es uno de los más utilizados y según los resultados de Ramos-Onsins & Rozas (2002) uno de los más potentes. El test fue realizado con el programa DNAsp v5 y su significancia fue calculada al 95 % de confianza, en base a 1000 simulaciones coalescentes.

Estadísticos de clase III. Esta clase se basa en la observación de la distribución generada a partir de las diferencias pareadas (*pairwise differences*) entre las secuencias. La distribución de las diferencias pareadas (*mismatch distribution*) es una metodología que, en ausencia de recombinación, permite hacer inferencia sobre eventos demográficos. Slatkin & Hudson (1992) y Rogers & Harpending (1992) muestran que una distribución errática o multimodal es propia de poblaciones con estabilidad demográfica y que una distribución suave y unimodal puede reflejar una expansión demográfica reciente. Adicionalmente, se evalúa el índice de desigualdad $raggedness = rg$ (Harpending et al., 1993; Harpending, 1994). Bajo un proceso de expansión reciente se espera que la muestra tenga valores bajos y no significativos de rg (Harpending, 1994). Aquí, mediante la *distribución de diferencias pareadas* se ponen a prueba los linajes obtenidos en la reconstrucción filogenética. Los cálculos fueron realizados con el programa DnaSp v5.1 (Librado & Rozas, 2009); la significancia del estadístico rg fue obtenida a partir de 1.000 réplicas.

Skyline-plot bayesiano

El skyline-plot bayesiano es una herramienta útil para estimar la variación en el tamaño efectivo poblacional (N_e) a través del tiempo. El método está basado en la teoría de la coalescencia, el cual cuantifica las relaciones entre la genealogía de las secuencias de ADN y la historia demográfica de la población (Kingman, 1982). Como ventaja de los otros skyline-plot (como el clásico o el generalizado), el *skyline-plot bayesiano* no requiere introducir modelos demográficos, ni tampoco una genealogía obtenida *a priori*. Usa directamente las secuencias y un modelo de evolución molecular para co-estimar la genealogía, las tasas de mutación y los tamaños efectivos poblacionales en un contexto temporal (Drummond et al., 2005). Otra ventaja respecto de sus predecesores es la incorporación de límites de confianza en las estimaciones. Ho & Shapiro (2011) hacen una revisión de los métodos existentes de skyline-plot y remarcen las principales diferencias entre ellos. Aquí se utilizará éste análisis para explorar la fluctuación de los tamaños efectivos poblacionales en los linajes de cada una de las especies.

El análisis se realizó con el programa BEAST v1.7, con un árbol de inicio en estrella, con un modelo “piecewise-constant” y contemplando 5 agrupaciones. El modelo de evolución nucleotídica para cada linaje fue obtenido con el programa jModelTest 2 bajo el modelo

de Información Akaike con corrección (AICc) (Akaike, 1974; Posada & Crandall, 2001a) contemplando los 88 modelos posibles. La tasa de mutación utilizada fue la calculada en este trabajo para ambos genes concatenados ($0,02602 \pm 8,85711 \times 10^{-5}$). Para cada linaje se genera una corrida con un reloj log-normal relajado de 20.000.000 interacciones de las cadenas de MCMC, muestreando los parámetros cada 1000 interacciones. El rendimiento de las MCMC y los resultados de los análisis fueron visualizados con el programa Tracer v1.5, el primer 20 % de los datos fueron descartados como *burn-in*.

El resultado del análisis es un gráfico que representa la media de $Ne \cdot \tau$ sobre el tiempo expresado en generaciones, donde Ne es el tamaño efectivo poblacional y τ es el tiempo generacional expresado en millones de años. El tiempo generacional de *P. fernandezae* es de 2 años (Marangoni et al., 2012) y el de *P. henselii* fue asumido como el mismo. Con ello se modificaron los gráficos, multiplicando el tiempo de coalescencia por 2 para obtener las edades absolutas de cada fluctuación.

Filogeografía bayesiana

En los apartados anteriores, fue descrita una serie de métodos que comúnmente son utilizados en el estudio de la demografía histórica. Estos métodos, sean los test estadísticos o los skyline-plots bayesianos, apuntan a reconocer cambios en el tamaño efectivo poblacional (Ne). Todos ellos utilizan información proveniente exclusivamente de las secuencias de ADN, sin incorporar la procedencia de la muestra (información geográfica). Durante un tiempo, los filogeógrafos, asociaban los haplogrupos a regiones geográficas mediante el Análisis de Clados Anidados (Templeton, 1998; 2008) y de esta manera se podía inferir la historia del grupo en un contexto geográfico. Varios autores demostraron que, en ciertas situaciones, el análisis de clados anidados puede proporcionar resultados erróneos (ver Knowles & Maddison, 2002; Panchal & Beaumont, 2007; Knowles, 2008) y por este motivo en la actualidad es poco usado.

Recientes aproximaciones probabilísticas apuntan a conectar nuevamente la genealogía con la información geográfica. Lemey et al. (2009), bajo el nombre de *filogeografía bayesiana*, desarrollan un método que utiliza información proveniente de las secuencias de ADN e incorpora la información geográfica de las muestras. El análisis considera los puntos de muestreo como entidades discretas y estima las tasas de dispersión entre estas poblaciones.

Análogamente a las tasas de sustitución nucleotídicas, las tasas de dispersión no tienen por qué ser homogéneas o constantes entre poblaciones discretas. A fin de eliminar la suposición de homogeneidad de dispersión y la restricción del espacio discreto, Lemey et al. (2010) desarrollaron el modelo de difusión espacial de caminatas aleatorias-continuas (*relax random walk*, RRW), donde se puede relajar las tasas de dispersión y considerar el espacio como un continuo.

Buscando explorar el centro de origen y los patrones de dispersión de cada especie aquí estudiada, se realizó un análisis con el modelo de caminatas aleatorias continuas en el espacio (RRW), con un modelo de dispersión homogénea. El modelo molecular usado para cada especie fue el propuesto por el jModeltest2 y la tasa de sustitución nucleotídica utilizada fue la calculada en este trabajo, $0,02602 \pm 8,85711 \times 10^{-5}$. La corrida se realizó en el programa BEAST v1.7 y consistió en 20.000.000 de interacciones para *P. henselii* y 70.000.000 para *P. fernandezae*. En ambos casos los parámetros fueron muestreados cada 4000 interacciones. La convergencia de la corrida fue visualizada en Tracer v1.5, donde se chequeó la estacionariedad de los parámetros (ESS). Posteriormente al análisis se buscó el árbol consenso de máxima credibilidad utilizando el TreeAnnotator v1.7, descartando el primer 20 % de los árboles como *burn-in*. El árbol obtenido representa la reconstrucción de la historia demográfica en espacio y tiempo. El último paso del análisis se realizó con el programa Spread v1 (Bielejec et al., 2011), que transforma toda la información en una animación que puede ser visualizada en el programa GoogleEarth (disponible en <http://earth.google.com>).

3.1. Análisis interespecífico

3.1.1. Alineamiento

Para realizar el análisis filogenético se obtuvo una matriz con los genes *12S-tRNA^{Val}-16S*. Al utilizar diferentes métodos de alineamiento se encontró un amplio rango en la longitud de los árboles obtenidos. La mayor diferencia entre la longitud de los árboles obtenidos fue de 451 y 152 pasos, considerado los gaps como 5^{to} estado y como entradas faltantes, respectivamente. En ambos casos la mayor diferencia se observó entre los alineamientos producidos con la estrategia Q-INS-i (Mafft) y el programa Muscle. Con el programa Mafft bajo la estrategia Q-INS-i se obtuvieron los árboles más cortos: 9094 pasos con los gaps como 5^{to} estado y 8662 con gaps como entradas faltantes. Los gaps son provocados por inserciones o deleciones (indels) y en este trabajo se considera que este tipo de mutaciones presenta señal filogenética. Por lo tanto, todos los análisis fueron realizados utilizando la matriz que dio los árboles óptimos con los gaps como 5^{to} estado, es decir, la obtenida con el alineamiento Q-INS-i (Tabla 3.1).

Adicionalmente, para explorar las diferencias que pueden provocar los distintos alineamientos, se compararon las topologías de los árboles de consenso estricto generados con el

3. Resultados

2^{do} y 3^{er} alineamiento más parsimonioso con los gaps como 5^{to} estado. En el Apéndice II, se presentan los consensos estrictos de las topologías resultantes obtenidas con los alineamientos Q-INS-i, L-INS-i y G-INS-i con los gaps como 5^{to} y el Q-INS-i con los gaps como entradas faltantes.

Programa	Estrategia	Gaps internos como estado		Gaps internos como <i>missing</i>	
		Árboles óptimos	Pasos	Árboles óptimos	Pasos
Clustal-X	por defecto	8	9189	8	8681
Muscle	por defecto	4	9545	8	8814
Mafft	FFT-NS-i	8	9171	2	8719
Mafft	G-INS-i	16	9151	24	8742
Mafft	L-INS-i	4	9124	8	8737
Mafft	Q-INS-i	2	9094	8	8662

Tabla 3.1: Detalles de los árboles de máxima parsimonia obtenidos a partir de las diferentes estrategias de alineamiento; la estrategia que generó los árboles más óptimos se señala en negrita.

3.1.2. Análisis filogenético

Máxima parsimonia

Aquí se presenta el consenso estricto de los dos árboles más óptimos (9094 pasos) obtenidos con el alineamiento Q-INS-i con los gaps internos considerados como 5^{to} estado (Figura 3.1). Tanto en el árbol aquí presentado, como en los mostrados en el Apéndice II, se obtiene al género *Physalaemus* como un grupo monofilético con buena medida de soporte. Dentro del género se pueden identificar dos clados, el primero de ellos compuesto por *Physalaemus nattereri* como especie basal, más los grupos *P. signifer* + *P. crombiei* y *P. atlanticus* + *P. spiniger*. A excepción de *P. nattereri* que tiene una amplia distribución en Brasil, Paraguay y Bolivia, el resto de las especies pertenecientes a este clado presentan distribuciones acotadas sobre la Mata Atlántica costera de Brasil.

El segundo clado se compone de las otras 13 especies aquí utilizadas y, aunque su nodo basal no presentó una buena medida de soporte, se pueden distinguir tres agrupaciones. El

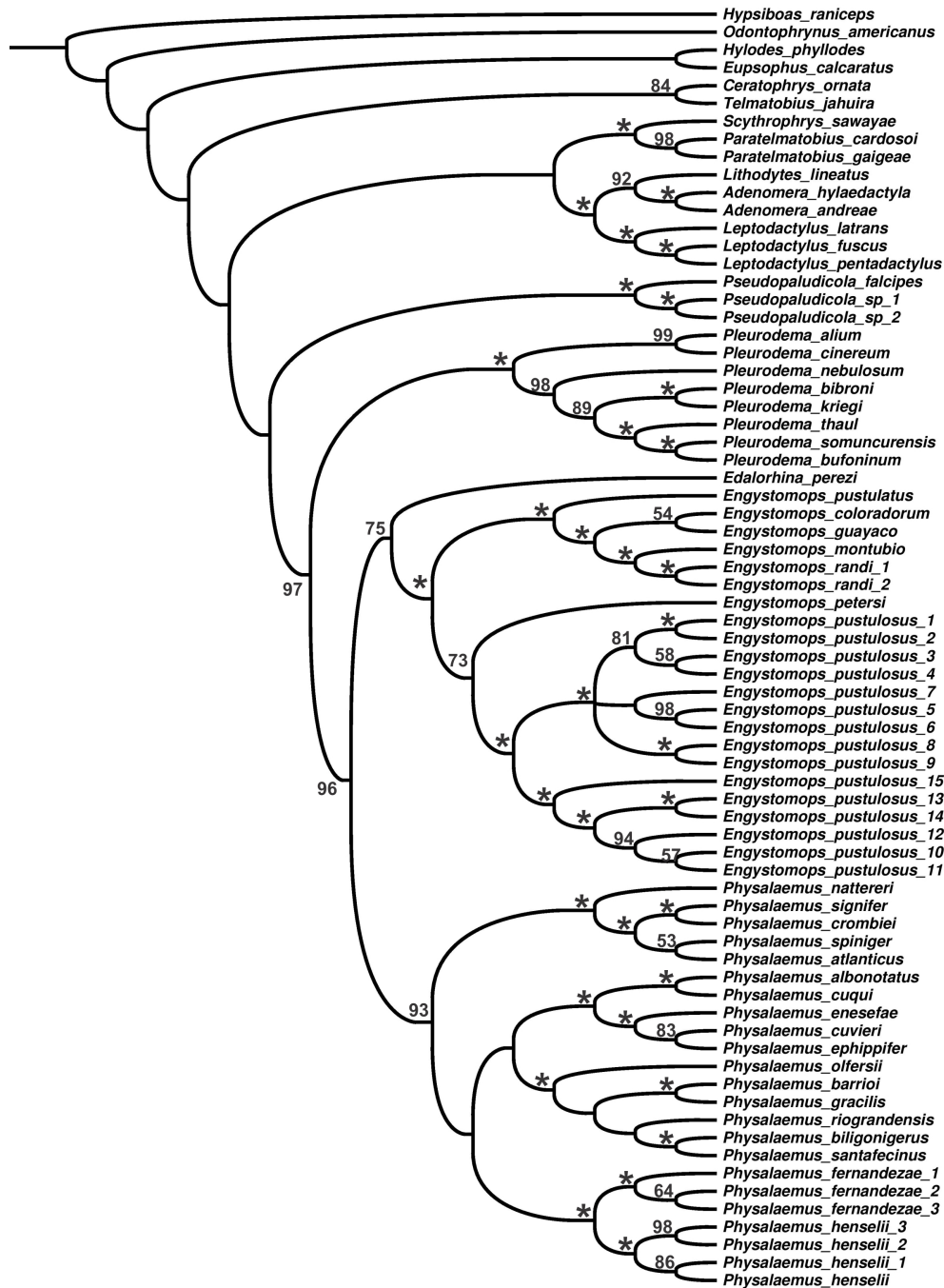


Figura 3.1: Consenso estricto de los dos árboles obtenidos por máxima parsimonia (9094 pasos) con el alineamiento Q-INS-i con los gaps considerados como 5^{to} estado. En los nodos se muestra el soporte de *jackknife* como frecuencias absolutas; con asteriscos (*) se indica un soporte de 100 %; los nodos sin valores corresponden a soportes ≤ 50 %.

análisis recupera un clado basal compuesto por *P. fernandezae* + *P. henselii*, más otros dos grupos. Uno está compuesto por *P. albonotatus*, *P. cuqui*, *P. enesefae*, *P. cuvieri* y *P. ephippifer*,

y el otro por *P. olfersii*, *P. barrioi*, *P. gracilis*, *P. riograndensis*, *P. santafecinus* y *P. biligonigerus*. Esta misma relación, de *Physalaemus* monofilético y sus agrupaciones internas, también se observan en los árboles realizados con otros alineamientos (G-INS-i y L-INS-i) y con éste mismo alineamiento utilizando los gaps como entradas faltantes (ver Apéndice II). El análisis de máxima parsimonia apoya, con buen soporte, que *P. fernandezae* y *P. henselii* son especies hermanas, y adicionalmente, muestra que el grupo de especies *Physalaemus henselii* no incluye a *P. riograndensis* (Figura 3.1).

Como hermano del género *Physalaemus* se obtiene al clado compuesto por *Engystomops*+*Edalorhina*, y en la base de estos tres géneros a *Pleurodema*. En el análisis también se recupera la subfamilia Leiuperinae (*sensu* Pyron & Wiens, 2011), pero esta relación está débilmente soportada. El género *Pseudopaludicola* toma la posición basal de la subfamilia, pero al igual que en otros trabajos no presenta una buena medida de soporte (Grant et al, 2006; Pyron & Wiens, 2011; Fouquet et al., 2013). De hecho, cuando se exploraron las topologías obtenidas con otros alineamientos, *Pseudopaludicola* toma distintas posiciones, siendo un género que posee relaciones bastante inestables.

Inferencia bayesiana

La aproximación bayesiana se realizó con la misma matriz utilizada en los análisis de máxima parsimonia (alineamiento Q-INS-i). Para dicha matriz, el programa jmodelTest 2 (Posada, 2008) determinó que el modelo de evolución nucleotídica que más se ajusta a los datos es el *modelo general reversible* (Tavaré, 1986) con sitios invariables y distribución gamma (GTR+G+I).

Como ya se mencionó previamente, el programa BEAST permite estimar de manera simultánea la topología del árbol y los tiempos de divergencia. Aquí siempre se utilizó la misma matriz y el mismo modelo de evolución molecular. En cada corrida se calibró un nodo diferente y ésta fue la única variante de cada prueba.

Con respecto a la topología dentro de Leiuperinae, todos los análisis bayesianos presentan congruencia entre sí y una buena congruencia con la topología obtenida con máxima parsimonia. La diferencia más importante es la posición del género *Edalorhina*. En este análisis se recupera como hermano de *Engystomops* + *Physalaemus*, mientras que con el análisis de parsimonia se obtuvo a *Physalaemus* como hermano de *Engystomops* + *Edalorhina*. La posición

Figura 3.2: Árbol bayesiano de las relaciones filogenéticas, las medidas de soporte (*probabilidades posteriores*) sólo se muestran en los nodos con un soporte < al 95 %. El soporte es expresado como el rango obtenido entre los cuatro análisis realizados. Con gris se muestra el tiempo de permanencia de la transgresión marina. Los números señalan el nodo calibrado en cada prueba realizada y las barras ubicadas en el nodo *P. fernandezae* + *P. henselii* representan, con el mismo color que el número, el valor medio y el desvío del tiempo de divergencia obtenido en cada pruebas. Debajo se muestra una escala de tiempo en millones de años.

3. Resultados

de *Pleurodema* se mantiene basal respecto a *Physalaemus*, *Engystomops* y *Edalorhina*, y al igual que con parsimonia, el género *Pseudopaludicola* se recupera en la base de la subfamilia Leiuperinae con muy bajo soporte.

Las relaciones internas de *Physalaemus* son completamente congruentes con el análisis de parsimonia, aunque aquí se obtienen mayores valores de las medidas de soporte para los clados internos. Por lo tanto, el análisis bayesiano también apoya la hipótesis de que *P. fernandezae* y *P. henselii* son especies hermanas, y adicionalmente, se rechaza la inclusión de *P. riograndensis* en el grupo de especies *Physalaemus henselii*.

Con respecto a los tiempos de divergencia, se realizaron las cuatro pruebas mencionadas en materiales y métodos. En el árbol bayesiano (Figura 3.2) se marcan los nodos utilizados para calibrar cada una de las corridas independientes. Las cuatro pruebas dieron la misma topología y por este motivo los resultados se resumieron en un mismo árbol. En la base del árbol se muestra una escala de tiempo en millones de años y con gris se marca el momento de la ingresión marina (15-5 Ma). Cada una de las pruebas o nodos calibrados presenta, además del número de prueba, un color. Con rojo se referencia la prueba 1, con azul la prueba 2, con blanco la prueba 3 y con verde la prueba 4. Respetando los colores de los nodos dados, se muestra con un círculo la media y con una barra los desvíos al 95 % de confianza de los valores de divergencia entre *P. fernandezae* y *P. henselii* obtenidos en los diferentes análisis. La **prueba 1** mostró una edad media de 16,67 Ma y un rango al 95 % de confianza de [7,22–27,8], en la **prueba 2** se obtuvo un valor medio de 14,18 Ma y un rango de [6,56–23,31], para la **prueba 3** la media fue de 16,24 Ma y un rango de [7,93–27,61] y en la **prueba 4** la media fue de 13,56 y un rango de [6,45–22,42]. Dado que todas las medias presentan valores cercanos a los 15 Ma y que los desvíos al 95 % de confianza nunca dan valores menores o iguales a 5 Ma, momento en que se retiró el mar, todas las pruebas apoyan la hipótesis que *Physalaemus fernandezae* y *P. henselii* divergieron como resultado de un proceso vicariante causado por la ingresión marina llamada “Mar Paranaense”.

Estimación de la tasa de mutación

Una vez igualada la longitud de las secuencias, la matriz con ambos genes concatenados presentó una longitud de 1444 pb. Para esta matriz el modelo sugerido por el AICc fue el modelo de tres parámetros (Kimura, 1981) con distribución gamma y sitios invarian-

tes (TPM1uf+G+I). Al separar la matriz por cada gen se obtuvo una longitud de 720 pb para el gen *Cyt-B* y 722 pb para el fragmento de *D-loop*. Los modelos seleccionados para cada matriz fueron el *modelo general reversible* más distribución gamma (GTR+G) y el *Hasegawa-Kishino-Yano* (Hasegawa et al., 1985) más distribución gamma y sitios invariantes (HKY+I+G), respectivamente.

Datación	<i>Cyt-b</i> 720pb	<i>D-loop</i> 722pb	Ambos genes 1444pb
14±1 Ma	0,01416±8,0556x10 ⁻⁵	0,0367±2,1193x10 ⁻⁴	0,02602±8,5711x10 ⁻⁵
5±1 Ma	0,04573±3,3742x10 ⁻⁴	0,1181±1,1571x10 ⁻³	0,08562±1,1177x10 ⁻³

Tabla 3.2: Tasas de mutación estimadas para dos genes mitocondriales y para ambos genes concatenados en el clado *Physalaemus fernandezae* + *Physalaemus henselii*. Se muestran los valores medios y sus desvíos utilizando dos puntos de calibración. El primer punto (14±1 Ma) corresponde con el momento de la transgresión marina y el segundo (5±1 Ma) al momento en que se retiró el mar.

Los resultados se especifican en la Tabla 3.2, donde se muestran las tasas de mutación con sus desvíos estándares obtenidos para cada gen por separado y para ambos concatenados, según los dos tiempos de divergencia considerados.

3.2. Sitios de Muestreo y Distribución

Para *P. fernandezae* se obtuvieron un total de 107 muestras provenientes de diversas localidades de la provincia de Buenos Aires: Punta Lara (partido de Ensenada), La Balandra (partido de Berisso), Punta Indio (partido de Magdalena), Chascomús (partido de Chascomús), Gral Conesa (partido de Gral. Lavalle), Dolores (partido de Dolores), Pinamar (partido de Gral Juan Madariaga), Mar de Cobo (partido de Mar Chiquita), Energía (partido de San Cayetano), Ayacucho (partido de Ayacucho), Daireux (partido de Daireux), Gral La Madrid (partido de Gral La Madrid) y Las Flores (partido de Las Flores) (Figura 3.3).

En el muestreo de *P. henselii* se obtuvieron 55 muestras repartidas entre el Parque Nacional “El Palmar” (provincia de Entre Ríos, departamento de Colón) en Argentina, sobre la Ruta N° 7 (departamento de Florida), en Rocha (departamento de Rocha), Sierra del Tigre (departamento de Treinta y Tres) y Pueblo Madera (departamento de Rivera) para Uruguay

3. Resultados

Especie	Población	Ubicación	Coordenadas	N
<i>P. fernandezae</i>	Punta Lara	Ensenada, Bs As, ARG	34° 48.199'S - 58° 0.595'W	11
<i>P. fernandezae</i>	La Balandra	Berisso, Bs As, ARG	34°56.843'S - 57°44.177'W	8
<i>P. fernandezae</i>	Punta Indio	Magdalena, Bs As, ARG	35°13.921'S - 57°19.113'W	9
<i>P. fernandezae</i>	Chascomús	Chascomús, Bs As, ARG	35°34.003'S - 57°56.197'W	9
<i>P. fernandezae</i>	Dolores	Dolores, Bs As, ARG	36°18.556'S - 57°36.695'W	7
<i>P. fernandezae</i>	Gral Conesa	Tordillo, Bs As, ARG	36°18.556'S - 57°36.695'W	11
<i>P. fernandezae</i>	Las Flores	Las Flores, Bs As, ARG	37°07.190'S - 56°58.089'W	5
<i>P. fernandezae</i>	Ayacucho	Ayacucho, Bs As, ARG	37°09.460'S - 58°27.695'W	5
<i>P. fernandezae</i>	Mar de Cobo	Mar Chiquita, Bs As, ARG	37°45.749'S - 57°26.965'W	7
<i>P. fernandezae</i>	Energía	San Cayetano, Bs As, ARG	38°33.131'S - 59°21.383'W	10
<i>P. fernandezae</i>	Gral La Madrid	Gral La Madrid, Bs As, ARG	37°23.960'S - 61°01.172'W	7
<i>P. fernandezae</i>	Daireux	Daireux, Bs As, ARG	36°35.218'S - 61°46.298'W	10
<i>P. fernandezae</i>	Pinamar	Gral Madariaga, Bs As, ARG	37°06.908'S - 56°57.813'W	8
<i>P. henselii</i>	Rocha	Ruta 10 Km255, Rocha, UY	34°26.286'S - 53°55.341'W	8
<i>P. henselii</i>	Ruta 7	Ruta 7, Km139, Florida, UY	33°52.436'S - 55°34.545'W	5
<i>P. henselii</i>	Ruta 7	Ruta 7 Km154, Florida, UY	33°47.835'S - 55°28.966'W	7
<i>P. henselii</i>	Sierra del Tigre	S. del Tigre, Treinta y Tres, UY	33°16.854'S - 54°53.511'W	5
<i>P. henselii</i>	Sierra del Tigre	S. del Tigre II, Treinta y Tres, UY	33°17.829'S - 55°04.889'W	2
<i>P. henselii</i>	Pueblo Madera	Pueblo Madera, Rivera, UY	30°58.133'S - 55°34.099'W	10
<i>P. henselii</i>	El Palmar	PN El Palmar, Entre Ríos, ARG	31°52.158'S - 58°14.744'W	4
<i>P. henselii</i>	El Palmar	PN El Palmar II, Entre Ríos, ARG	31°53.345'S - 58°15.143'W	1
<i>P. henselii</i>	São Sepé	São Sepé, Rio Grande do Sul, BR	30°10.508'S - 53°34.771'W	2
<i>P. henselii</i>	Eldorado do Sul	Rio Grande do Sul, BR	30°05.475'S - 51°40.227'W	10
<i>P. henselii</i>	Gravataí	Gravataí, Rio Grande do Sul, BR	29°48.453'S - 50°55.634'W	1

Tabla 3.3: Poblaciones muestreadas para este estudio con sus ubicaciones geográficas y cantidad de ejemplares (N) para cada una. Cuando la población presentó mas de un sitio, se detalla su ubicación y cantidad de ejemplares, bajo el mismo nombre de la población. Referencias: Argentina (ARG), Uruguay (UY), Brasil (BR).

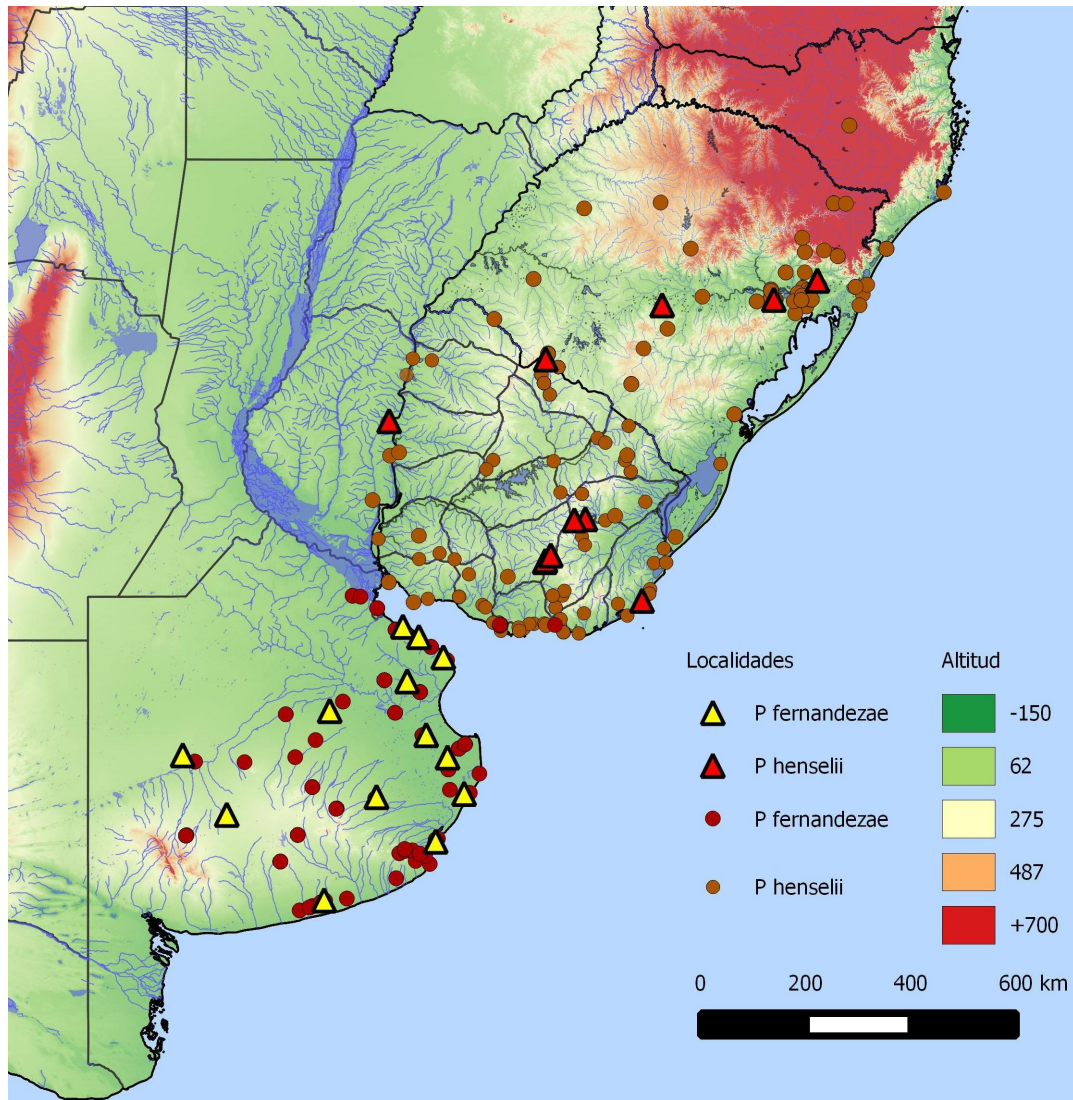


Figura 3.3: Localidades analizadas: con círculos se indican las localidades analizadas a partir de material depositado en las colecciones, y con triángulos las localidades muestreadas en este trabajo.

y las localidades de São Sepé, Eldorado do Sul y Gravataí pertenecientes al estado de Rio Grande do Sul, Brasil. En la Tabla 3.3 se muestran detalles de coordenadas geográficas y cantidad de muestras por cada localidad. Algunos sitios de muestreo (charcos), se encontraron muy cercanos y en esos casos se los consideró como la misma población. Estos sitios se indican en la Tabla 3.3 como la misma población pero con más de una referencia (e.g. Sierra del Tigre, Sierra del Tigre II).

Para la confección del mapa de distribución se obtuvieron 916 datos, 411 pertenecientes a *P. fernandezae* y 505 de *P. henselii*. En el mapa (Figura 3.3) se muestran con círculos las localidades analizadas a partir de material depositado en las colecciones, y con triángulos

3. Resultados

localidades de donde se obtuvieron muestras. Como se puede observar, *Physalaemus fernandezae* presenta su distribución en gran parte de la provincia de Buenos Aires, a excepción de unas pocas localidades conocidas para Uruguay, mientras que *P. henselii* abarca desde unos pocos registros al sur de Santa Catarina (Brasil), casi la totalidad del estado de Rio Grande do Sul (Brasil) y Uruguay, llegando en su límite oeste hasta la provincia de Entre Ríos, Argentina. Sólo *P. henselii* presenta algunos registros en altura, pero en rasgos generales ambas especies ocupan las llanuras de la región “pampa” (*sensu* Morrone, 2001) con un quiebre entre ambas especies delimitado por el Río Paraná y Río de la Plata. En el mapa también se puede observar que las localidades de muestreo obtenidas abarcan casi todo el rango geográfico en ambas especies.

Tomando las locaciones más externas se calculó una aproximación del área de distribución de cada especie, siendo aproximadamente de 200 mil km² para *P. fernandezae* y unos 530 mil km² para *P. henselii*.

3.3. Análisis intraespecífico de *Physalaemus henselii*

3.3.1. Diversidad genética

El fragmento de *Cyt-b*

En *P. henselii* se obtuvieron 55 secuencias de un fragmento de *Cyt-b* con una longitud de 725 pb. En esta matriz fueron hallados 72 sitios variables, 41 son parsimoniosamente informativos y 31 corresponden a mutaciones simples (no informativas), que resultaron en 33 haplotipos. Las secuencias analizadas para este fragmento no registraron indels (inserciones-deleciones). El número que identifica a cada haplotipo, la distribución por localidad de muestreo y el número de individuos en que fue hallado se muestra en el **Apéndice III**.

El fragmento de *Cyt-b* presenta una alta diversidad haplotípica ($Hd=0,964$) y nucleotídica ($\pi=0,01644$). Al tomar como unidad las poblaciones muestreadas, se puede observar que la diversidad haplotípica (Hd) presenta un amplio rango de variación. En la población de “El Palmar” es nula ($Hd=0$), pero contrariamente, su valor es máximo ($Hd=1$) en la localidad de “Sierra del Tigre” (zona central de Uruguay). A pesar que la Hd más alta fue encontrada en “Sierra del Tigre” el valor más alto de diversidad nucleotídica corresponde a la localidad de “São Sepé” ($\pi=0,02497$), Rio Grande do Sul, Brasil (Tabla 3.4).

A nivel regional las poblaciones del centro y sudeste de Uruguay son las que presentaron los valores más altos de diversidad haplotípica, mientras que el patrón es inverso respecto a la diversidad nucleotídica (Tabla 3.4). No se encontraron haplotipos compartidos entre las poblaciones, excepto el haplotipo H8, compartido entre las poblaciones de “Sierra del Tigre” y “Ruta 7” (centro de Uruguay). El haplotipo H2 es el que presenta la mayor frecuencia encontrándose en cinco individuos restringidos a la población monomórfica de “El Palmar”.

El fragmento de *D-loop*

En este fragmento también fueron obtenidas 55 secuencias procedentes de las mismas muestras analizadas para el gen *Cyt-B*. Después de su alineamiento, la matriz fue recortada al tamaño de la secuencia más corta para que todas tuvieran la misma longitud, quedando un total de 757 pb por individuo. Al igual que en *Cyt-b*, fueron identificados 33 haplotipos pero mucho más variables. En el alineamiento fueron hallados 85 sitios polimórficos, 56 sitios parsimoniosamente informativos y 29 mutaciones simples. Para este fragmento sí se

3. Resultados

encontraron indels que generaron 8 gaps en el alineamiento (Apéndice III).

Población	Fragmento de <i>Cyt-b</i> (725 pb)						Fragmento de <i>D-loop</i> (757 pb)					
	<i>N</i>	<i>k</i>	simples	inform	<i>Hd</i>	π	<i>N</i>	<i>k</i>	simples	inform	<i>Hd</i>	π
Ruta 7	12	8	10	6	0,924	0,00543	12	9	14	3	0,955	0,00523
Sierra del Tigre	7	7	14	3	1	0,00583	7	6	12	2	0,952	0,00610
Rocha	8	5	3	4	0,857	0,01172	8	5	6	4	0,857	0,00457
El Palmar	5	1	0	0	0	0	5	2	2	0	0,400	0,00106
Pueblo Madera	10	5	9	1	0,667	0,00297	10	3	4	0	0,378	0,00106
Eldorado do Sul	10	8	15	8	0,933	0,00846	10	5	24	10	0,867	0,01201
Gravataí	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
São Sepé	2	2	18	0	1	0,02483	2	2	21	0	1	0,02796
Total	55	33	31	41	0,970	0,01771	55	33	29	56	0,966	0,02689

Tabla 3.4: Diversidad genética de *Physalaemus henselii* para cada fragmento (*Cyt-b* y *D-loop*). En cada población se muestra la cantidad de secuencias (*N*), la cantidad de haplotipos (*k*), el número de mutaciones simples o *singletons* (simples), la cantidad de mutaciones informativas (inform), la diversidad haplotípica (*Hd*) y la diversidad nucleotídica (π).

Para el total de las muestras, los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica mostraron valores altos, $Hd=0,966$ y $\pi=0,02689$. La diversidad haplotípica (*Hd*) presentó valores bajos ($Hd=0,400$) en la población de “El Palmar” y el valor más alto fue observado en la localidad de “Ruta 7” ($Hd=0,955$), en las cercanías de Montevideo, Uruguay. El índice de diversidad nucleotídica (π) presentó valores bajos ($\pi=0,00106$) en las poblaciones de “El Palmar” y “Pueblo Madera”, y valores altos en las localidades de “Eldorado do Sul” ($\pi=0,01201$) y “São Sepé” ($\pi=0,02796$), ambas en Rio Grande do Sul, Brasil (Tabla 3.4).

El patrón de diversidad a nivel regional es similar al encontrado con el fragmento de *Cyt-b*. Las poblaciones del centro y sudeste de Uruguay son las que presentaron los índices de diversidad haplotípica más altos, mientras que las poblaciones del este y norte presentaron valores de diversidad menores (Tabla 3.4). Con respecto a la diversidad nucleotídica este patrón se invierte, los valores más altos se encontraron en las poblaciones del norte, “São Sepé” y “Eldorado do Sul” y no se encontraron haplotipos compartidos entre poblaciones, excepto el haplotipo H8 que se encontró en dos poblaciones, “Sierra del Tigre” y “Ruta 7” (centro de Uruguay). El haplotipo H2 se presentó con mayor frecuencia encontrándose presente en cuatro individuos restringidos a la localidad de “El Palmar” (ver Apéndice III).

Diversidad genética con ambos genes concatenados

A partir de las secuencias concatenadas de *Cyt-b* y *D-loop* se obtuvo una matriz de 55 terminales y 1482 pb para cada individuo. Se obtuvieron 38 haplotipos definidos por 157 sitios variables, de los cuales 97 sitios son parsimoniosamente informativos, 60 corresponden a mutaciones simples y 8 gaps. En la tabla del **Apéndice III** se presenta la información de los haplotipos.

<i>P. henselii</i> Cyt-b+D-loop (1482 pb)						
Población	<i>N</i>	<i>k</i>	simples	inform	<i>Hd</i>	π
Ruta 7	12	10	24	9	0,97	0,00533
Sierra del Tigre	7	7	26	5	1	0,00678
Rocha	8	5	9	8	0,857	0,00407
El Palmar	5	2	2	0	0,400	0,00054
Pueblo Madera	10	5	13	1	0,667	0,00200
Eldorado do Sul	10	7	39	18	0,933	0,01027
Gravataí	1	1	0	0	0	0
São Sepé	2	2	39	0	1	0,02642
Total	55	38	60	97	0,978	0,02237

Tabla 3.5: Diversidad genética para cada población de *Physalaemus henselii* con ambos genes concatenados (*Cyt-b+D-loop*). Para cada población se muestra la cantidad de secuencias (*N*), la cantidad de haplotipos (*k*), el número de mutaciones simples o *singletons* (simples), la cantidad de mutaciones informativas (inform), la diversidad haplotípica (*Hd*) y la diversidad nucleotídica (π). Para ver detalles de cada localidad ir a la Tabla 3.3.

En el total de las muestras, se hallaron valores altos de la diversidad haplotípica ($Hd=0,964$) y nucleotídica ($\pi=0,01614$). Al igual que cuando se analizaron los fragmentos por separado, los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica con valores más bajos fueron encontrados en la población de “El Palmar”. El valor más alto de *Hd* se registró en la localidad de “Sierra del Tigre” (centro de Uruguay) y el mayor valor de π en “São Sepé”, Rio Grande do Sul, Brasil (Tabla 3.4).

De los 38 haplotipos hallados considerando ambos genes concatenados, solamente el ha-

plotipo H9 fue compartido por dos poblaciones, “Sierra del Tigre” y “Ruta 7”, sitios cercanos ubicados en el centro de Uruguay. Por otra parte, el haplotipo H2 fue el que mostró mayor frecuencia, fue hallado en cuatro individuos restringidos a la localidad de “El Palmar”. Para ver detalles de los haplotipos ir al **Apéndice III**.

3.3.2. Estructura genética en *Physalaemus henselii*

Árbol de haplotipos

El modelo que mejor se ajustó a los datos bajo el AICc fue el “modelo de tres parámetros” (K81) (Kimura, 1981) con distribución gamma (TPM1uf+G). En el árbol se pueden distinguir tres linajes o haplogrupos principales: el linaje A compuesto por 15 haplotipos, un linaje B compuesto por 22 haplotipos y el linaje C con sólo 2 haplotipos. Dentro del linaje A se recupera un haplotipo basal (H32) respecto de las otras dos agrupaciones (A1 y A2), que a su vez, están compuestas por 7 haplotipos cada una. Por otra parte, el linaje B se subdivide los sublinajes B1 con 12 haplotipos y B2 con 10 haplotipos. El linaje C fue recuperado como grupo hermano de B1+B2 y se compone solamente por 2 haplotipos que, a su vez, son divergentes entre sí (Figura 3.4).

Los haplotipos que componen el linaje A (H32+A1+A2) están restringidos a poblaciones del norte de la distribución de la especie: “Eldorado do Sul”, “São Sepé” (sur de Brasil), “Pueblo Madera” (norte de Uruguay) y “El Palmar” (Argentina). El linaje B (B1+B2) se restringe a las poblaciones del sur y centro de Uruguay, incluyendo “Sierra del Tigre”, “Ruta 7” y “Rocha”. El linaje C, haplotipos H6 y H36, se encuentra en las poblaciones de “Eldorado do Sul” y “Gravataí”, sur de Brasil.

En la Figura 3.5 se grafica la distribución de los linajes obtenidos en el árbol de haplotipos; los diagramas de torta muestran la ubicación geográfica de las poblaciones muestreadas y el tamaño de la torta es relativo a la cantidad de haplotipos encontrados en cada población. En cada diagrama se representan con diferentes colores los linajes y sublinajes recuperados en el árbol. En colores azules se representa al linaje A, en amarillo y naranja al linaje B y en rojo al linaje C. En la figura se puede observar con azul oscuro el haplotipo más basal del linaje A (H32), ubicado en localidad de “São Sepé”, en celeste se representa al sublinaje A1, geográficamente repartido entre “São Sepé” y “Eldorado do Sul”. En color azul se representa la distribución del sublinaje A2 que se distribuye entre las poblaciones de “El Palmar” y

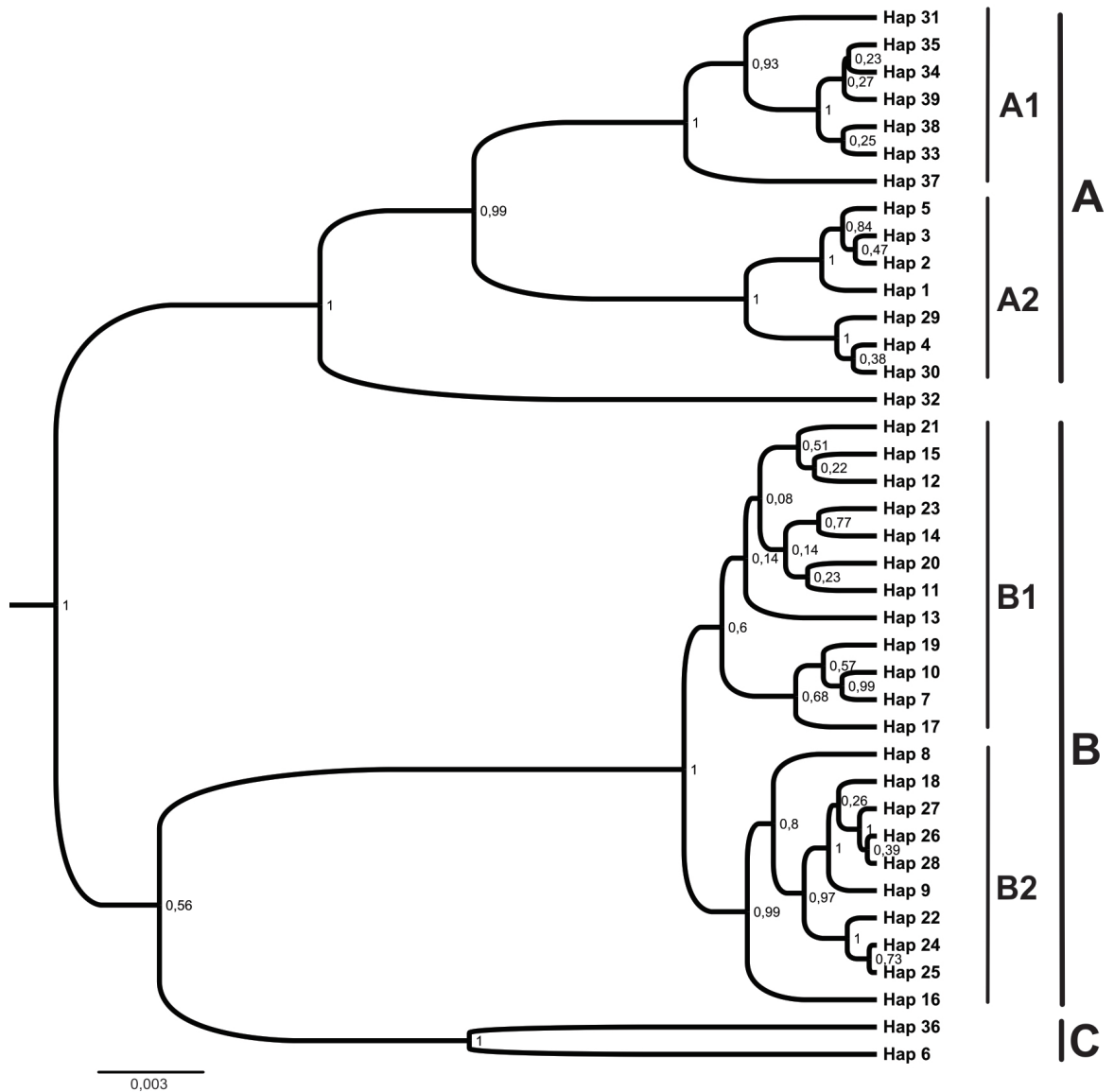


Figura 3.4: Relaciones filogenéticas entre los haplotipos de *Physalaemus henselii* recuperadas bajo inferencia bayesiana. Se observan tres linajes, el linaje A compuesto por el haplotipo H32 más los sublinajes A1 y A2; el linaje B, conformado por los sublinajes B1 y B2; y el linaje C. En los nodos indica la medida de soporte, la *probabilidad posterior* del nodo. La escala representa cantidad de sustituciones por sitio.

“Pueblo Madera”. En el linaje B se observa una distribución en el centro y sur de Uruguay, en naranja se puede ver como el sublinaje B1 compone la totalidad de los haplotipos de la población de “Rocha”, gran parte de “Sierra del Tigre” y llega hasta la población de “Ruta 7”. En amarillo se identifica al sublinaje B2 mayormente distribuido en “Ruta 7”, pero también alcanza a la población de “Sierra del Tigre”. En color rojo se muestra la ubicación geográfica

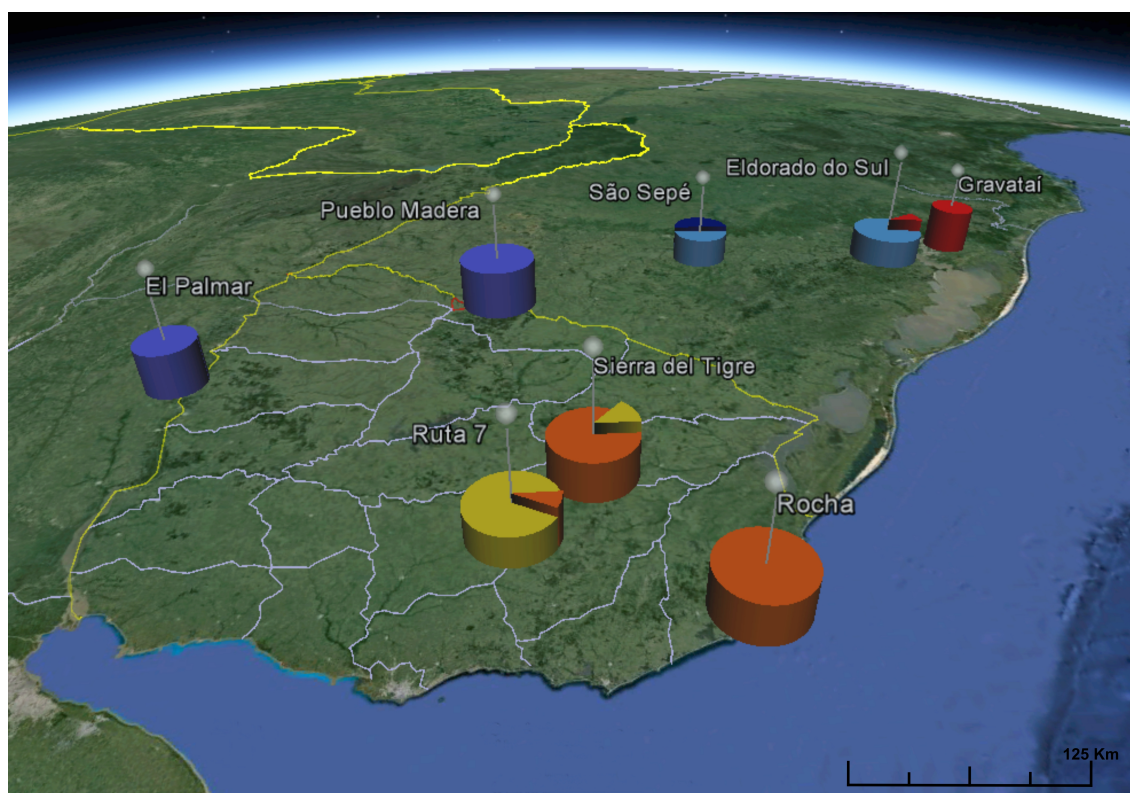


Figura 3.5: Distribución geográfica de los linajes recuperados en el análisis filogenético. El tamaño del gráfico de torta es relativo a la cantidad de haplotipos obtenidos en cada población. Con azul oscuro se representa al haplotipo basal del linaje A (H32), con celeste al sublinaje A1 y con azul al A2. Con naranja se representa al sublinaje B1, con amarillo al sublinaje B2 y con rojo al linaje C.

del linaje C, distribuido en las localidades de “Gravataí” y “Eldorado do Sul”, sudeste de Brasil (Figura 3.5).

Red de haplotipos

La red de haplotipos, al igual que el árbol de haplotipos, mostró que existen tres linajes principales (A, B y C) separados entre sí por 22-23 pasos mutacionales. En la Figura 3.6 se muestra la estructura de la red y se marcan sus linajes principales y sublinajes. Allí se puede observar que entre los linajes A y B existe una fuerte estructura geográfica, mientras que los linajes A y C se solapan en al menos una población (“Eldorado do Sul”). El linaje A está compuesto por 15 haplotipos, estos fueron hallados en las poblaciones de “El Palmar”, “Pueblo Madera”, “São Sepé” y “Eldorado do Sul”. El haplotipo H32 fue recuperado como hermano de A1+A2, es muy divergente (28 pasos mutacionales respecto de A1+A2) y fue hallado en

la localidad de “São Sepé”. De esta localidad fueron analizados sólo dos especímenes, el otro haplotipo (H33) se encuentra filogenéticamente relacionado con la población de “Eldorado do Sul” (parte del linaje A).

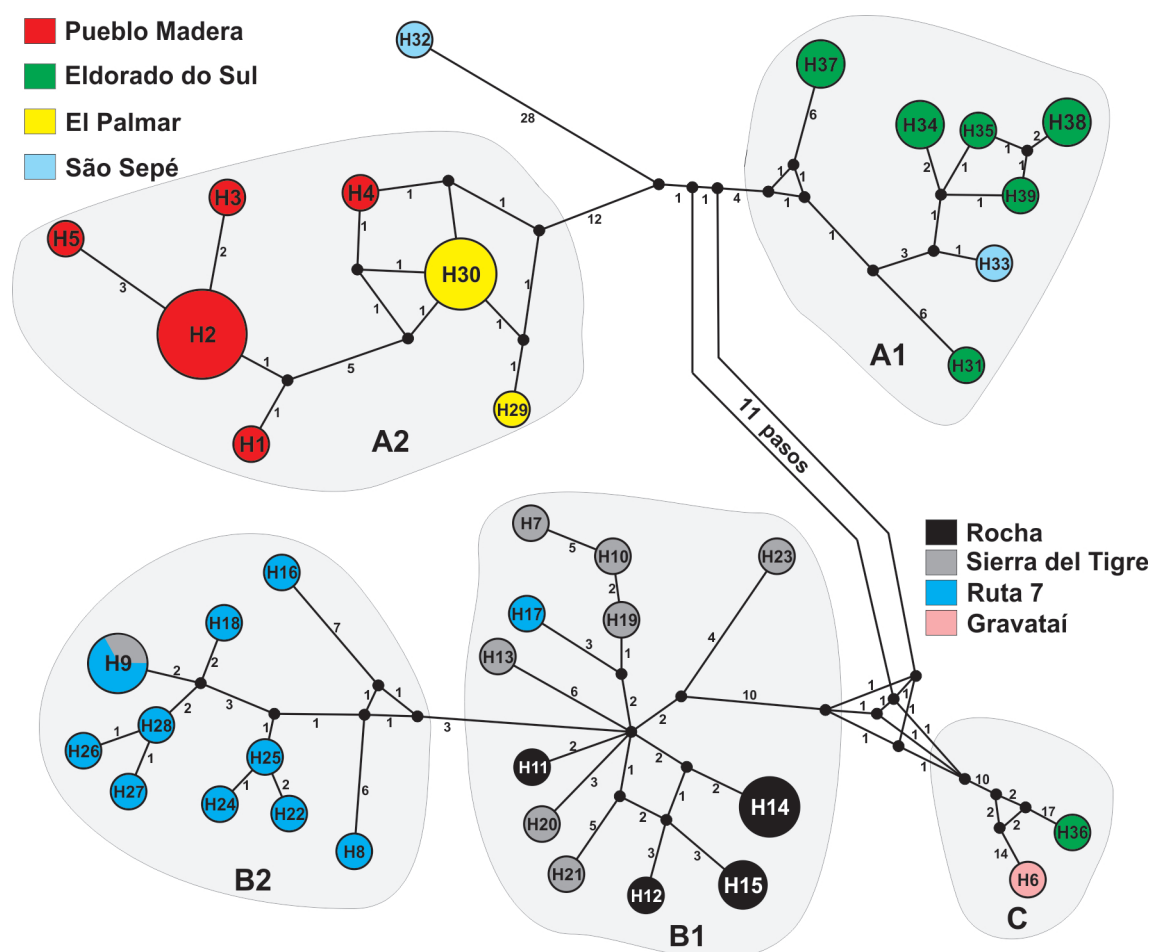


Figura 3.6: Red de haplotipos de *Physalaemus henselii*. La sigla dentro de cada esfera identifica cada haplotipo, el tamaño es relativo a la frecuencia del haplotipo y con el color se hace referencia a la población donde fue hallado. Los números ubicados en las ramas que conectan los haplotipos indican la cantidad de pasos mutacionales. Los círculos negros entre las ramas hacen referencia a haplotipos hipotéticos (no muestreados o extintos). En gris se remarcen las agrupaciones obtenidas.

Dentro del linaje A se diferencian los sublinajes A1 y A2, que se separan entre sí por 18 pasos mutacionales. El sublinaje A1 está compuesto por 7 haplotipos distribuidos en las localidades del sur de Brasil (“São Sepé” y “Eldorado do Sul”); ninguno de los haplotipos obtenidos en este sublinaje es compartido por más de una población y la frecuencia absoluta de cada uno de ellos no supera los dos ejemplares. La máxima distancia dentro del grupo es de 16 pasos mutacionales y se da entre los haplotipos H37 y H38. Por otra parte, el sublinaje A2

3. Resultados

también presenta 7 haplotipos, que se distribuyen en las localidades de “Pueblo Madera” y “El Palmar”, sin solapar su distribución geográfica con el sublinaje A1. Dentro del sublinaje A2 la mayor distancia mutacional es de 12 pasos entre los haplotipos H5 y H29. El haplotipo H2 fue el más frecuente ($n=5$) y se distribuye únicamente en la población de “Pueblo Madera”. El haplotipo H4 fue hallado en esta localidad pero evidencia tener mayor relación con el grupo del “El Palmar”. De las cinco muestras obtenidas en el “El Palmar” cuatro de ellas comparten el haplotipo H30.

La composición del linaje B también es congruente con lo obtenido en el árbol filogenético, presenta 22 haplotipos que forman 2 agrupaciones. Su distribución se corresponde con el centro y sudeste de Uruguay (“Sierra del Tigre”, “Rocha”, “Ruta 7”). En el sublinaje B1 fueron hallados 12 haplotipos que se distribuyen en las poblaciones de “Ruta 7”, “Sierra del Tigre” y “Rocha”. Los haplotipos más frecuentes del sublinaje B1 son el H14 y el H15, los cuales presentan una frecuencia absoluta de 2 y 3 respectivamente y ambos fueron hallados en la población de “Rocha”. El resto de los haplotipos de este sublinaje son únicos, con una frecuencia absoluta de un ejemplar. Dentro del grupo la máxima distancia fue de 16 pasos mutacionales, fue encontrada entre el haplotipo H7 y los haplotipos H12, H13, H14, H15, H21 y H23. En el sublinaje B2 se hallaron 10 haplotipos y la mayor parte de ellos se distribuyen en la localidad de “Ruta 7”. Únicamente el haplotipo H9 mostró una frecuencia de 3 y es el único haplotipo compartido entre dos poblaciones, “Ruta 7” y “Sierra del Tigre”. La máxima distancia mutacional dentro del grupo se observó entre el haplotipo H16 y los haplotipos H26 y H27 (15 pasos mutacionales).

El linaje C en el árbol filogenético fue recuperado como hermano del linaje B, está compuesto sólo por dos haplotipos poco frecuentes (H6 y H36) que fueron hallados exclusivamente en las localidades de “Gravataí” y “Eldorado do Sul”. Estos presentan una gran divergencia entre sí (31 pasos mutacionales) y respecto al linaje A (23 pasos) y el linaje B (22 pasos). El árbol filogenético de los haplotipos mostró al linaje C como grupo hermano del linaje B, pero esta relación no obtuvo una buena medida de soporte (Figura 3.4). La estructura de la red de haplotipos justifica considerar este clado (H6+H36) como un linaje separado de A y B. Cabe también destacar que el haplotipo H36 es el único ejemplar muestreado al norte del Río Jacuí y que el haplotipo H6 fue hallado en una población del sur de Río Jacuí, pero muy cercana. La poca representación de este linaje podría sugerir que: ambos haplotipos pertenecen a un

linaje relictual o que existe un linaje poco visualizado con el muestreo que se realizó.

Análisis Molecular de la Varianza en *P. henselii*

En la tabla de *Fst* pareados (Tabla 3.6) se puede observar que la población de “Gravataí” no presentan diferencias significativas con ninguna otra población, y que la población de “São Sepé” presenta diferencias únicamente con “Ruta 7”. Estos resultados deben ser considerados como preliminares debido a su escaso tamaño muestral ($n=1$ y $n=2$). A nivel regional se puede observar que cada una de las poblaciones del norte (“Pueblo Madera”, “Eldorado do Sul” y “El Palmar”) presentan una identidad propia, diferenciándose entre ellas y respecto de las poblaciones del sur. Las poblaciones del sur (“Ruta 7”, “Sierra del Tigre” y “Rocha”) también presentan identidad propia, pero los valores de *Fst* entre ellas más moderados.

	Pueblo Madera	Gravataí	El Palmar	São Sepé	Eldorado do Sul	Sierra del Tigre	Ruta 7	Rocha
Pueblo Madera	*	–	+	–	+	+	+	+
Gravataí	0,957	*	–	–	–	–	–	–
El Palmar	0,707	0,988	*	–	+	+	+	+
São Sepé	0,769	0,324	0,704	*	–	–	+	–
Eldorado do Sul	0,687	0,674	0,618	0,256	*	+	+	+
Sierra del Tigre	0,916	0,832	0,906	0,760	0,760	*	+	+
Ruta 7	0,923	0,881	0,916	0,835	0,809	0,241	*	+
Rocha	0,936	0,897	0,937	0,815	0,781	0,100	0,366	*

Tabla 3.6: Tabla de *Fst* pareados y su significancia en las poblaciones de *P. henselii*, con el símbolo (+) se muestran los resultados significativos y con (–) los no significativos. El nivel de significancia utilizado fue de 0,01.

La estructuración poblacional fue evaluada mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA), para lo cual se realizaron tres pruebas. La primera se realizó sin presentar niveles jerárquicos y excluyendo las poblaciones poco representadas “Gravataí” ($n=1$) y “São Sepé”

3. Resultados

(n=2). De esta manera se obtuvo un F_{st} de 0,82 ($p < 0,01$) mostrando una fuerte estructura entre las poblaciones. En la segunda prueba se usó como criterio de agrupación la existencia de accidentes geográficos y en base a la topografía se definieron tres grupos: el primer grupo está compuesto por tres poblaciones ubicadas al sudeste de la Cuchilla Grande de Uruguay (“Sierra del Tigre”, “Rocha” y “Ruta 7”), el segundo grupo se conformó por poblaciones sin aparentes quiebres geográficos, que al parecer están conectadas por llanuras (“São Sepé”, “Eldorado do Sul” y “Pueblo Madera”) y el tercer grupo está compuesto por una sola población que podría estar aislada por el Río Uruguay (“El Palmar”). La población de “Gravataí” se encuentra separada por el Río Jacuí, pero de esta se cuenta con un solo espécimen y por lo tanto no fue incorporada en el análisis.

Agrupaciones	Fuente de variación		
	entre grupos (Φ_{ct})	dentro de grupos (Φ_{sc})	dentro de población (Φ_{st})
[1, 2, 3, 4, 6, 7]	—	17,59 % (—)	82,41 % (0,82412*)
[1, 2, 3][4, 5, 6][7]	71,74 % (0,71742*)	15,62 % (0,55282*)	12,64 % (0,87364*)
[A1, A2][B1, B2][C]	72,30 % (0,72299)	6,69 % (0,24156*)	21,01 % (0,78990*)

Tabla 3.7: Análisis de la Varianza Molecular para diferentes pruebas de *Physalaemus henselii*. Con números se referencia a las poblaciones (1) Ruta 7, (2) Sierra del Tigre, (3) Rocha, (4) Eldorado do Sul, (5) São Sepé, (6) Pueblo Madera y (7) El Palmar. La primer prueba no presenta niveles jerárquicos y fueron excluidas las poblaciones de “Gravataí” y “São Sepé”. La segunda prueba corresponde con la agrupación basada en los accidentes geográficos y la tercer prueba se corresponde con los linajes filogenéticos. El símbolo (*) indica una significancia de $p < 0,01$.

La tercer forma de agrupar fue utilizando un criterio genealógico; en esta prueba se contemplaron todas las muestras y los grupos fueron definidos basados en los tres linajes principales que se recuperaron en el análisis filogenético. Todos los resultados se muestran en la Tabla 3.7. El nivel de significancia para todas las pruebas fue de 0,01.

Estos resultados mostraron que la mayor estructuración de la especie está dada entre los grupos geográficos: sur, centro-norte y oeste (prueba 2). Esta forma de agrupar explica un alto porcentaje de variación (72,30 %; $\Phi_{ct}=0,72$). Por otra parte el criterio de grupos genealógicos también mostró una alta variación (66,98 %), pero el índice de fijación carece de sustento estadístico. Probablemente se deba a que una de las poblaciones del sur de Brasil

(“São Sepé”) está compuesta por representantes de dos linajes (A y C).

Aislamiento por distancia

A fin de evaluar si la topología del terreno tiene consecuencias sobre el aislamiento por distancia se realizaron dos pruebas. En ambos casos se correlacionó la matriz de diferencias pareadas de *Fst* con la matriz de distancias geográficas. En la primera prueba las distancias entre las poblaciones fueron medidas en línea recta. En el momento en que se estaban tomando las distancias se observó que las “líneas rectas” que conectan las poblaciones del sudeste (“Ruta 7”, “Rocha” y “Sierra de Tigre”) con las del noroeste (“El Palmar” y “Pueblo Madera”), atravesaban dos accidentes geográficos de diferente índole: 1- la Cuchilla Grande y Cuchilla de Haedo de Uruguay y 2- el río de mayor caudal del territorio uruguayo, el Río Negro. Las cuchillas no presentan gran altura pero sí funcionan como líneas divisorias de aguas, por otra parte, el río presenta gran caudal y recorre en sentido noreste-sudoeste todo el territorio de Uruguay, interponiéndose entre las poblaciones ubicadas en el sudeste y noroeste. Por este motivo se evaluó una forma alternativa de medir las distancias. En la segunda prueba las distancias fueron tomadas evitando atravesar las cuchillas y el Río Negro. Esto implica distancias más largas que recorren “camino” por zonas de bajas alturas. En la Figura 3.7 se representa cómo fueron tomadas las medidas en cada una de las pruebas. En la figura no fueron indicadas todas las flechas posibles, simplemente se grafica un esquema general. Previamente a realizar las pruebas de Mantel, se examinó si las matrices de distancias geográficas presentaban diferencias significativas, con este fin se realizó una prueba de *Mann-Whitney* entre las matrices y se verificó que existen diferencias significativas entre las dos formas de medir ($p < 0,05$).

En ambos casos se obtuvo un marcado aislamiento por distancia. La prueba realizada tomando las distancias en línea recta presenta una buena correlación ($r=0,73$; $p < 0,05$). Pero al tomar las distancias esquivando los accidentes geográficos la correlación muestra un mejor ajuste y mayor significancia ($r=0,78$; $p < 0,001$). El resultado apoya la hipótesis que estos accidentes geográficos (las cuchillas o el río) tienen influencia sobre la estructura poblacional.

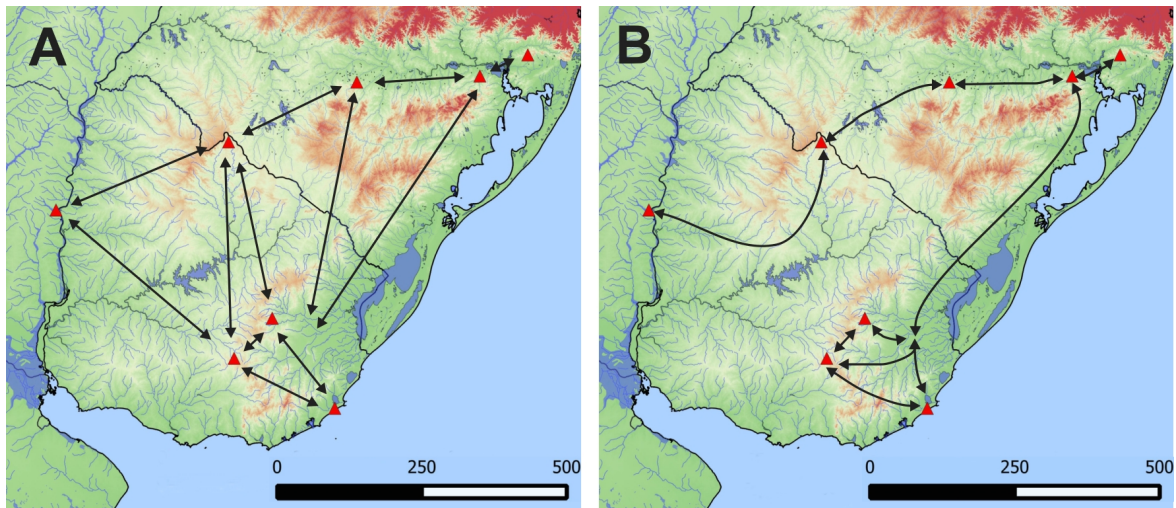


Figura 3.7: Distancias entre poblaciones de *Physalaemus henselii*. En **A** muestra como fueron tomadas las distancias en línea recta y en **B** se muestra como fueron tomadas evitando atravesar las cuchillas y el Río Negro. La escala representa kilómetros.

3.3.3. Historia demográfica

En esta sección se presentan valores de diversidad genética agrupando los haplotipos en base a los linajes obtenidos en la reconstrucción genealógica. En los tres linajes principales, A, B y C, se puede observar una alta diversidad haplotípica (Hd) y una muy alta diversidad nucleotídica (π), aunque debe tenerse en cuenta que los resultados del linaje C fueron obtenidos con sólo dos ejemplares. En el linaje A el haplotipo H32 es muy divergente y provoca que la diversidad nucleotídica tome valores elevados cuando se analiza la totalidad de linaje, sin embargo cuando se analizan sus sublinajes (A1, A2) la diversidad nucleotídica (π) toma valores más moderados, pero la diversidad haplotípica (Hd) aumenta su valor en el sublinaje A1 evidenciando mayor cantidad de haplotipos únicos. En el linaje B también se encontraron índices altos de diversidad haplotípica y nucleotídica que disminuyen cuando se analizan sus sublinajes por separado (Tabla 3.8). El linaje C está compuesto de dos haplotipos (H6, H36) que son muy divergentes entre sí, esto se refleja en el alto valor obtenido con el índice de diversidad nucleotídica (π). Debido a que solamente se contó con dos muestras de este linaje, no pudieron ser realizadas las pruebas de neutralidad.

Las pruebas de neutralidad realizadas para todas las muestras de la especie mostraron valores negativos pero no significativos para la D de Tajima's, F_s de Fu's y el R_2 , los cuales estarían sugiriendo una estabilidad demográfica. Pero el índice rg mostró un valor bajo y no

3.3. Análisis intraespecífico de *Physalaemus henselii*

Linaje	k	$Hd \pm sd$	π	D de Tajima's	Fs de Fu's	rg	R_2
A	14	0,920 \pm 0,036	0,01207	-0,2569	-2,4798	0,0427	0,1307
A1	7	0,933 \pm 0,062	0,00542	-0,0759	-0,3575	0,1684	0,1615
A2	7	0,800 \pm 0,083	0,00329	-0,2974	0,6631	0,2127	0,1272
B	21	0,977 \pm 0,017	0,00659	-1,4789	-6,7849**	0,0226	0,0640**
B1	12	0,962 \pm 0,040	0,00529	-1,4876	-2,4798	0,1237	0,0716*
B2	10	0,939 \pm 0,058	0,00446	-1,1836	-1,4050	0,0432	0,1130
C	2	1	0,02099	—	—	2,0000	0,5000
Todos	38	0,978 \pm 0,009	0,02237	-0,43684	-2,4798	0,0006	0,0948

Tabla 3.8: Diversidad genética y pruebas de neutralidad en los diferentes linajes de *Physalaemus henselii*. Para cada uno se muestra la cantidad de haplotipos (k), la diversidad haplotípica con su desvío estándar ($Hd \pm sd$) y la diversidad nucleotídica (π). En los estadísticos se marcan los valores de significancia: un (*) para $P < 0,01$ y dos (**) para $P < 0,02$. La línea (—) indica que no se pudo computar.

significativo lo cual, contradice al resto de los estadísticos, sugiriendo una expansión demográfica. El promedio de la cantidad de diferencias pareadas es de 32,979, y la distribución de las diferencias pareadas genera una gráfica errática o multimodal (Figura 3.8). Por lo tanto, a excepción del valor de rg , todos los resultados apoyaron que la especie se encuentra en equilibrio demográfico. El linaje A y sus sublinajes (A1 y A2) no presentan indicios de expansión demográfica; todos los estadísticos son no significativos y la distribución de las diferencias pareadas resulta en una gráfica errática, el promedio de diferencias pareadas fue de 17,813, 8,0 y 4,867, para el linaje A, A1 y A2, respectivamente.

Por el contrario en el linaje B los estadísticos muestran indicios de un proceso de expansión poblacional, a pesar que la prueba D de Tajima mostró valores negativos pero no significativos, resultado que sugiere estabilidad demográfica. Los valores de Fs y R_2 son valores negativos y significativos ($P < 0,02$), y el valor de rg es bajo y no significativo, estos tres estadísticos detectan un proceso de expansión demográfica para el linaje B. Según la evaluación realizada por Ramos-Onsins & Rozas (2002) el valor de R_2 y el Fs son pruebas muy potentes para determinar expansión poblacional y por lo tanto aquí se considera que este

3. Resultados

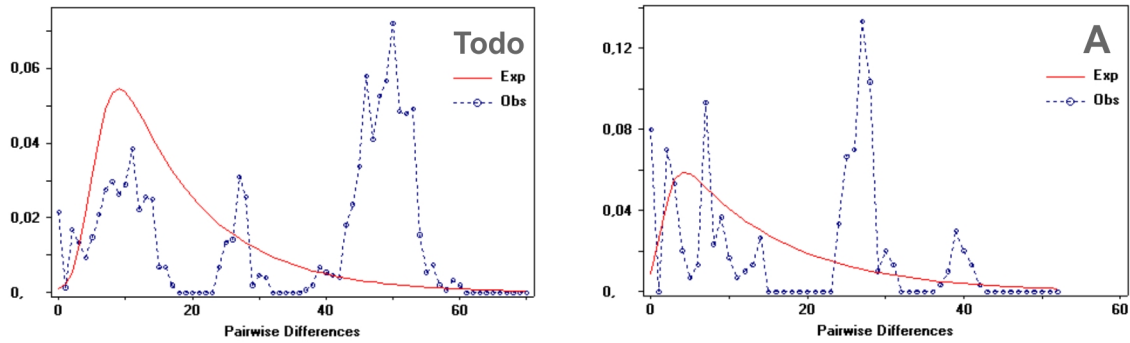


Figura 3.8: Distribución de las diferencias pareadas en todas las muestras de *Physalaemus henselii* (derecha) y en el linaje A (izquierda). Con líneas punteadas se indica la distribución de los datos y con línea roja continua la distribución esperada bajo el modelo de expansión demográfica.

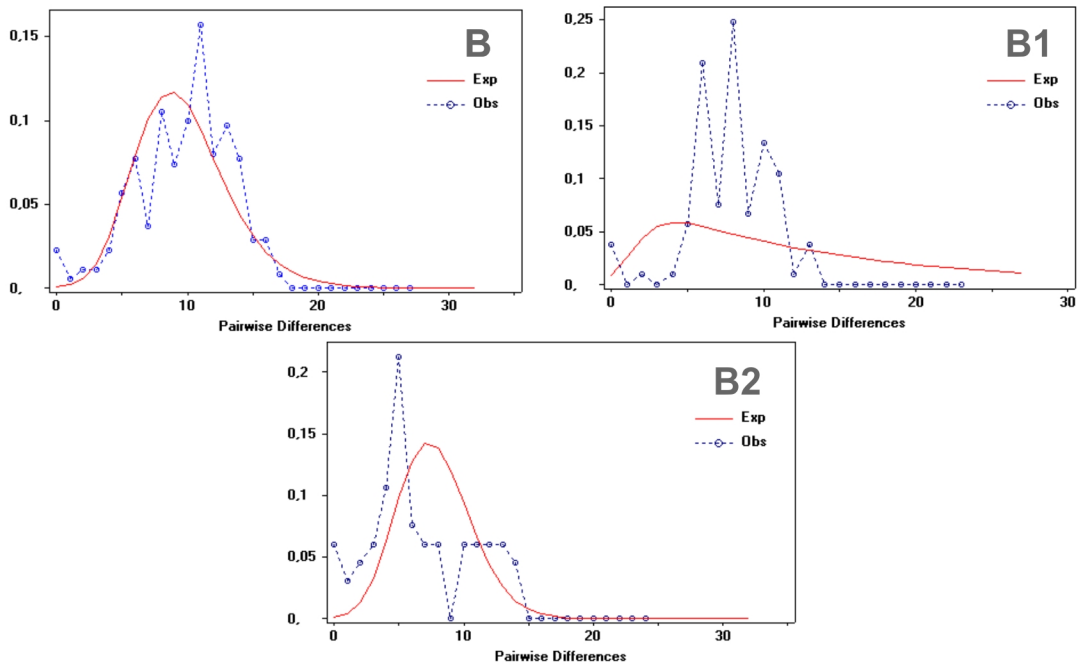


Figura 3.9: Distribución de las diferencias pareadas en el linaje B y sublinajes B1 y B2 de *Physalaemus henselii*. Con líneas punteadas se indica la distribución de los datos y con línea roja continua la distribución esperada bajo el modelo de expansión demográfica.

proceso está ocurriendo en el linaje B.

La distribución de diferencias pareadas también apoya un proceso de expansión demográfica. Presentó un promedio de diferencias pareadas de 9,712 y la distribución de las diferencias pareadas mostró una gráfica unimodal, muy similar a la esperada bajo un proceso de expansión (Figura 3.9). Los sublinajes B1 y B2 presentaron un promedio de diferencias pareadas

das de 7,810 y 6,576 respectivamente. Únicamente el estadístico de R_2 sugirió una expansión para el sublinaje B1, pero el resto de las pruebas mostraron resultados indican estabilidad demográfica. Las distribuciones de las diferencias pareadas son un tanto erráticas para ambos sublinajes (Figura 3.9). El linaje C cuenta con sólo dos secuencias, motivo por el que no es analizado.

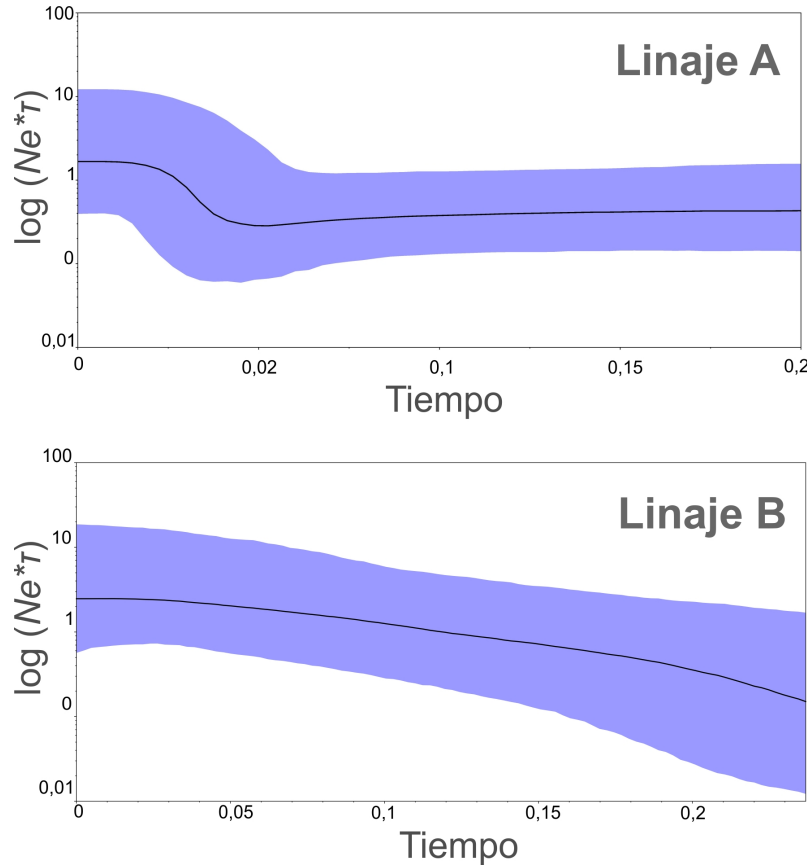


Figura 3.10: Skyline-plot bayesiano de cada linaje de *Physalaemus henselii*. En los gráficos se muestra con una línea negra la media del tamaño efectivo poblacional y en azul los límites de confianza al 95 %. En la abscisa se representa el tiempo en millones de años y en la ordenada el $\log (Ne*\tau)$, donde Ne es el tamaño efectivo poblacional y τ es el tiempo generacional.

Los skyline-plots bayesianos proveen una mayor resolución acerca de las fluctuaciones de tamaño efectivo poblacional en el tiempo. En la Figura 3.10 se muestran los resultados del análisis para los linajes A y B; debido a las pocas muestras que lo representan, el linaje C no fue evaluado. En el linaje A se observa un crecimiento demográfico que comenzó hace aproximadamente 40 mil años, pero que se estabiliza y mantiene constante desde hace ~20 mil años, la curva muestra que en la actualidad el tamaño efectivo poblacional se encuentra

3. Resultados

estable, resultado congruente con los estadísticos. Con respecto al linaje B, se puede observar un incremento demográfico que comenzó hace aproximadamente 250 mil años, pero a diferencia del linaje A, el proceso continúa hasta la actualidad. Este proceso de expansión fue detectado por todas las pruebas realizadas, excepto por el estadístico D de Tajima que sugirió estabilidad.

El resultado obtenido en el análisis de filogeografía bayesiana propone un origen de *Phyllanthus hirsutus* situado en algún lugar entre el norte de Uruguay y sur de Brasil (área azul oscura de la Figura 3.11A). Posteriormente a su origen, la especie, se dispersó por medio de tres rutas principales. En la Figura 3.11B se pueden observar: una ruta dirigida hacia el norte llegando a la región de “Gravataí” y “Eldorado do Sul”, otra ruta con dirección oeste conectando el área ancestral con la población de “Pueblo Madera” y una tercera ruta que se dirige hacia el centro-sur de Uruguay, población de “Sierra del Tigre”. En la Figura 3.11C se puede ver como la ruta dirigida hacia el centro-sur de Uruguay se diversificó, dando lugar al grupo que en otros análisis se recuperó como linaje B. En la misma figura se observa una interacción entre las poblaciones de “Sierra del Tigre”–“Ruta 7” y desde allí una dispersión unidireccional y posterior diversificación en la región cercana a la población de “Rocha”. En la Figura 3.11D también se observa que la dispersión en dirección oeste aún no alcanzó su distribución actual, mientras la ruta sur ya se encuentra ocupando el mismo territorio que en el presente (Figura 3.11D). La ruta que se dirige hacia el oeste corresponde al linaje A, en su dispersión primero conecta el área ancestral con la zona de “Pueblo Madera” y desde allí se dirige al extremo oeste de la distribución de la especie, la localidad de “El Palmar”. En cuanto al linaje C se puede observar que desde los momentos tempranos de dispersión existen ramas que se dirigen en dirección norte, pero no es posible visualizar la historia del grupo. El mismo patrón que fue recuperado con este análisis se puede observar en la Figura 3.5 donde se muestran las distribuciones espaciales de los linajes.

La historia obtenida con el análisis de filogeografía bayesiana es congruente con otros análisis. Los tres linajes principales A, B y C también fueron recuperados en el árbol filogenético y en la red de haplotipos. Es evidente que desde momentos tempranos, previo a la diversificación de sus linajes, la especie tomó direcciones geográficas definidas. En la actualidad únicamente se superponen dos de ellos (A y C) en el área cercana a la población de “Eldorado do Sul”.

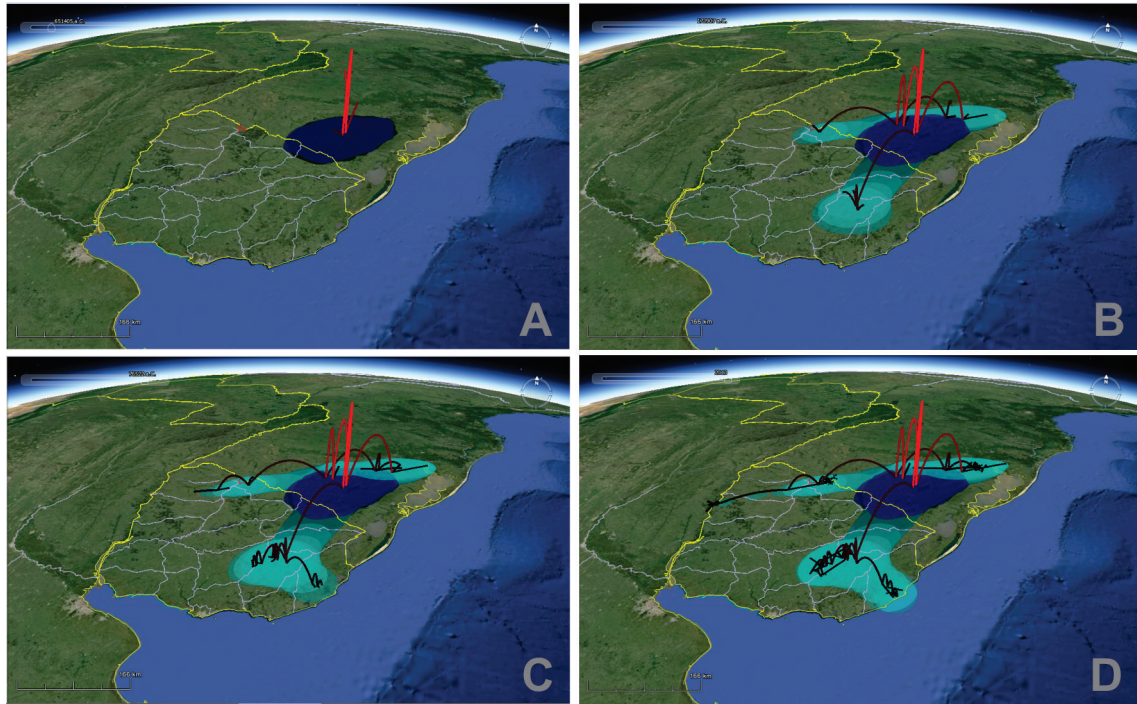


Figura 3.11: Difusión de *Physalaemus henselii* a través del tiempo. Reconstrucción bayesiana, en A se representa el centro de origen, en B y C dos momentos posteriores y en D el presente. El árbol de máxima credibilidad obtenido mediante el análisis de filogeografía bayesiana se encuentra representado sobre el terreno. En rojo se representan las ramas más basales del árbol y se van oscureciendo hacia las ramas más derivadas. Las regiones azules, sobre el terreno, representan la ubicación geográfica de las ramas con un 80 % de credibilidad. El azul oscuro se corresponde con las más basales y se aclara hacia las ramas más derivadas

La relación entre el skyline-plot bayesiano y el análisis de filogeografía bayesiana muestra que el proceso de dispersión del linaje A fue acompañado de un crecimiento en el tamaño efectivo poblacional durante un breve lapso de tiempo (aproximadamente hace unos 10-20 mil años). En cambio, el proceso de dispersión del linaje B siempre fue acompañado de un incremento en el tamaño efectivo poblacional, esto se puede observar en la Figura 3.10B.

3.4. Análisis intraespecífico de *Physalaemus fernandezae*

3.4.1. Diversidad genética

El fragmento de *Cyt-b*

En *P. fernandezae* se obtuvieron 107 secuencias de un fragmento de *Cyt-b* con una longitud de 708 pb. En esta matriz se encontraron 34 sitios variables, 19 son parsimoniosamente informativos y 15 corresponden a mutaciones simples (no informativas), que resultaron en 33 haplotipos. En las secuencias analizadas para este fragmento no se encontraron indels (inserciones o deleciones). El número que identifica a cada haplotipo, la distribución de los haplotipos por localidad y su frecuencia se muestran en el **Apéndice IV**.

En el fragmento de *Cyt-b* se observó una alta diversidad haplotípica ($Hd=0,921$) y una diversidad nucleotídica moderada ($\pi=0,0049$). Al tomar como unidad las poblaciones muestreadas, se puede observar que la diversidad presenta un amplio rango de variación. Los valores más bajos de diversidad haplotípica corresponden a las poblaciones marginales de “Energía” ($Hd=0,356$) y “Daireux” ($Hd=0,378$), mientras que poblaciones con ubicación más central como “Chascomús” presentan valores altos ($Hd= 0,944$). En cuanto a la diversidad nucleotídica (π) se encontraron poblaciones con índices muy bajos ($\pi= 0,0008$) en la población de “Gral La Madrid” o ($\pi= 0,00099$) en “Energía”. El valor más alto ($\pi=0,00628$) fue hallado en “Chascomús” (Tabla 3.9).

A nivel regional las poblaciones costeras del centro de la distribución (“Gral Conesa”, “Chascomús”, “Mar de Cobo” y “Dolores”) son las que presentaron los índices más elevados de variación genética. Desde esta región hacia las poblaciones del oeste, norte y sur los niveles de variación genética disminuyen (ver Tabla 3.9). De los 33 haplotipos dos dos de ellos son muy frecuentes, el haplotipo H1 representado por 21 ejemplares distribuido en tres poblaciones (“Energía”, “Gral La Madrid” y “Daireux”), y el haplotipo H17 representado por 17 ejemplares y compartido entre siete poblaciones (“Pinamar”, “Dolores”, “Gral Conesa”, “Energía”, “Ayacucho”, “Mar de Cobo” y “Daireux”), siendo éste el haplotipo de *Cyt-b* con mayor distribución geográfica.

El fragmento de *D-loop*

En este fragmento también se obtuvieron 107 secuencias procedentes de las mismas muestras analizadas para el gen *Cyt-b*. Después de su alineamiento, la matriz fue recortada al tamaño de la secuencia más corta para que todas tengan la misma longitud, quedando un total de 709 pb por individuo. En la matriz se identificaron 50 haplotipos, que se definen por 61 sitios variables: 40 sitios parsimoniosamente informativos y 21 mutaciones simples. Para este fragmento se encontraron indels que generaron tres gaps en el alineamiento (ver **Apéndice IV**).

Para la muestra total los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica mostraron valores altos ($Hd=0,971$ y $\pi=0,00993$). A nivel poblacional “Mar de Cobo” mostró la diversidad haplotípica más elevada ($Hd=1$), seguida por las poblaciones de “Gral Conesa”, “Chascomús” y “Dolores”. La diversidad nucleotídica presenta su mayor valor en la población de “Chascomús” ($\pi=0,01202$) y el menor valor corresponde a “Gral La Madrid” ($\pi=0,0216$) (ver Tabla 3.9).

Población	Fragmento de <i>Cyt-b</i> (717 pb)						Fragmento de <i>D-loop</i> (709 pb)					
	<i>N</i>	<i>k</i>	simples	inform	<i>Hd</i>	π	<i>N</i>	<i>k</i>	simples	inform	<i>Hd</i>	π
Ayacucho	5	3	2	2	0,800	0,00279	5	3	8	3	0,800	0,00707
Chascomús	9	7	3	8	0,944	0,00628	9	6	10	13	0,917	0,01202
Daireux	10	3	1	2	0,378	0,00127	10	5	1	7	0,822	0,00406
Dolores	7	5	2	4	0,905	0,00359	7	5	6	7	0,905	0,00714
Energía	10	2	0	2	0,356	0,00099	10	2	0	7	0,356	0,00352
Gral Conesa	11	7	4	4	0,909	0,00385	11	9	12	8	0,945	0,00869
Gral La Madrid	7	3	2	0	0,524	0,00080	7	4	0	3	0,857	0,00216
Mar de Cobo	7	4	9	0	0,714	0,00359	7	7	13	6	1,000	0,00943
La Balandra	8	3	6	1	0,607	0,00269	8	4	13	1	0,750	0,00520
Las Flores	5	2	4	0	0,400	0,00223	5	2	12	0	0,400	0,00679
Pinamar	8	3	1	3	0,607	0,00214	8	2	6	0	0,429	0,00364
Punta Indio	9	6	5	3	0,889	0,00364	9	6	20	2	0,833	0,00739
Punta Lara	11	4	1	4	0,745	0,00284	11	5	2	13	0,818	0,00885
Total	107	33	15	19	0,921	0,00490	107	49	21	40	0,971	0,00993

Tabla 3.9: Diversidad genética en *Physalaemus fernandezae* para cada fragmento (*Cyt-b* y *D-loop*). En cada población se muestra la cantidad de secuencias (*N*), la cantidad de haplotipos (*k*), el número de mutaciones simples (simples), la cantidad de mutaciones informativas (inform), la diversidad haplotípica (*Hd*) y la diversidad nucleotídica (π).

Al igual que para el fragmento de *Cyt-b*, a nivel regional las poblaciones costeras del centro de la distribución (“Gral Conesa”, “Chascomús”, “Mar de Cobo” y “Dolores”) presentaron los índices más altos de variación genética. Las poblaciones del oeste, norte y sur mostraron los valores más bajos (ver Tabla 3.9). El haplotipo H38 fue hallado en ocho individuos de la población de “Energía” y el haplotipo H21 también fue hallado en ocho individuos, pero repartidos entre las poblaciones de “Pinamar”, “Dolores” y “Gral Conesa”; estos dos fueron los haplotipos más frecuentes. También existen otros haplotipos compartidos pero ninguno en más de dos poblaciones (e.g. H1; H4, H7; H8; H10, etc.) (ver **Apéndice IV**).

Diversidad genética con ambos genes concatenados

A partir de las secuencias concatenadas de *Cyt-b* y *D-loop* se obtuvo una matriz de 107 individuos y 1426 pb para cada individuo. Se obtuvieron 57 haplotipos definidos por 95 sitios variables, 59 son parsimoniosamente informativos, 36 corresponden a mutaciones simples y tres a gaps. El número que identifica a cada haplotipo, su distribución por localidad y su frecuencia se muestran en la tabla del **Apéndice IV**.

En la muestra se observa una alta diversidad haplotípica ($Hd=0,983$) y nucleotídica ($\pi=0,00739$). El patrón de distribución de la diversidad es muy similar al observado en cada uno de los genes por separado. El índice de diversidad haplotípica con valor más bajo ($Hd=0,0356$) se observó en “Energía” y el valor máximo de diversidad ($Hd=1,0$) en la localidad de “Mar de Cobo”. La diversidad nucleotídica (π) presentó un rango desde valores bajos ($\pi=0,00147$) en la población de “Gral La Madrid” a valores altos ($\pi=0,00913$) en la localidad de “Chascomús” (ver Tabla 3.9).

La distribución de la diversidad genética obtenida con cada marcador por separado y con la matriz concatenada son congruentes. Los índices de diversidad más altos siempre son obtenidos en las poblaciones del centro-este de la distribución, ubicadas en zonas costeras al sur de la bahía de Samborombón. Las poblaciones marginales del oeste y sur presentaron menor variabilidad (Tabla 3.10). No se encontraron haplotipos ampliamente distribuidos, el haplotipo H44 fue el más frecuente encontrado en ocho individuos pertenecientes a la localidad de “Energía”, los haplotipos H8, H11 y H45 presentan una frecuencia de cinco ejemplares y ninguno de ellos se distribuye en más de tres poblaciones.

<i>P. fernandezae</i> Cyt- <i>b</i> + <i>D</i> -loop (1462 pb)						
Población	<i>N</i>	<i>k</i>	simples	inform	<i>Hd</i>	π
Ayacucho	5	3	10	5	0,800	0,00492
Chascomús	9	7	13	21	0,944	0,00913
Daireux	10	5	2	9	0,822	0,00265
Dolores	7	5	8	11	0,905	0,00535
Energía	10	2	0	9	0,356	0,00225
Gral Conesa	11	10	16	12	0,982	0,00626
Gral La Madrid	7	5	2	3	0,905	0,00147
Mar de Cobo	7	7	22	6	1,000	0,00649
La Balandra	8	4	19	2	0,750	0,00394
Las Flores	5	2	16	0	0,400	0,00449
Pinamar	8	3	1	9	0,607	0,00288
Punta Indio	9	7	25	5	0,944	0,00550
Punta Lara	11	5	3	17	0,818	0,00582
Total	107	57	36	59	0,980	0,00739

Tabla 3.10: Diversidad genética en *Physalaemus fernandezae* con ambos genes concatenados (Cyt-*b*+*D*-loop). Para cada población se muestra la cantidad de secuencias (*N*), la cantidad de haplotipos (*k*), el número de mutaciones simples o *singletons* (simples), la cantidad de mutaciones informativas (inform), la diversidad haplotípica (*Hd*) y la diversidad nucleotídica (π).

3.4.2. Estructura genética en *Physalaemus fernandezae*

Árbol de haplotipos

El modelo que mejor se ajustó a los datos bajo el AICc fue el modelo de tres parámetros (K81) (Kimura, 1981) con distribución gamma y sitios invariantes (TPM1uf+G+I). En el árbol se pueden distinguir dos linajes o haplogrupos principales: el linaje A compuesto por 16 haplotipos y el linaje B compuesto por 48 haplotipos. Sólo dentro del linaje B se recuperan sublinajes: el B1 compuesto por 16 haplotipos como hermano de las otras dos agrupaciones (B2+B3). Los sublinajes B2 y B3 presentaron 10 y 17 haplotipos respectivamente (Figura 3.12).

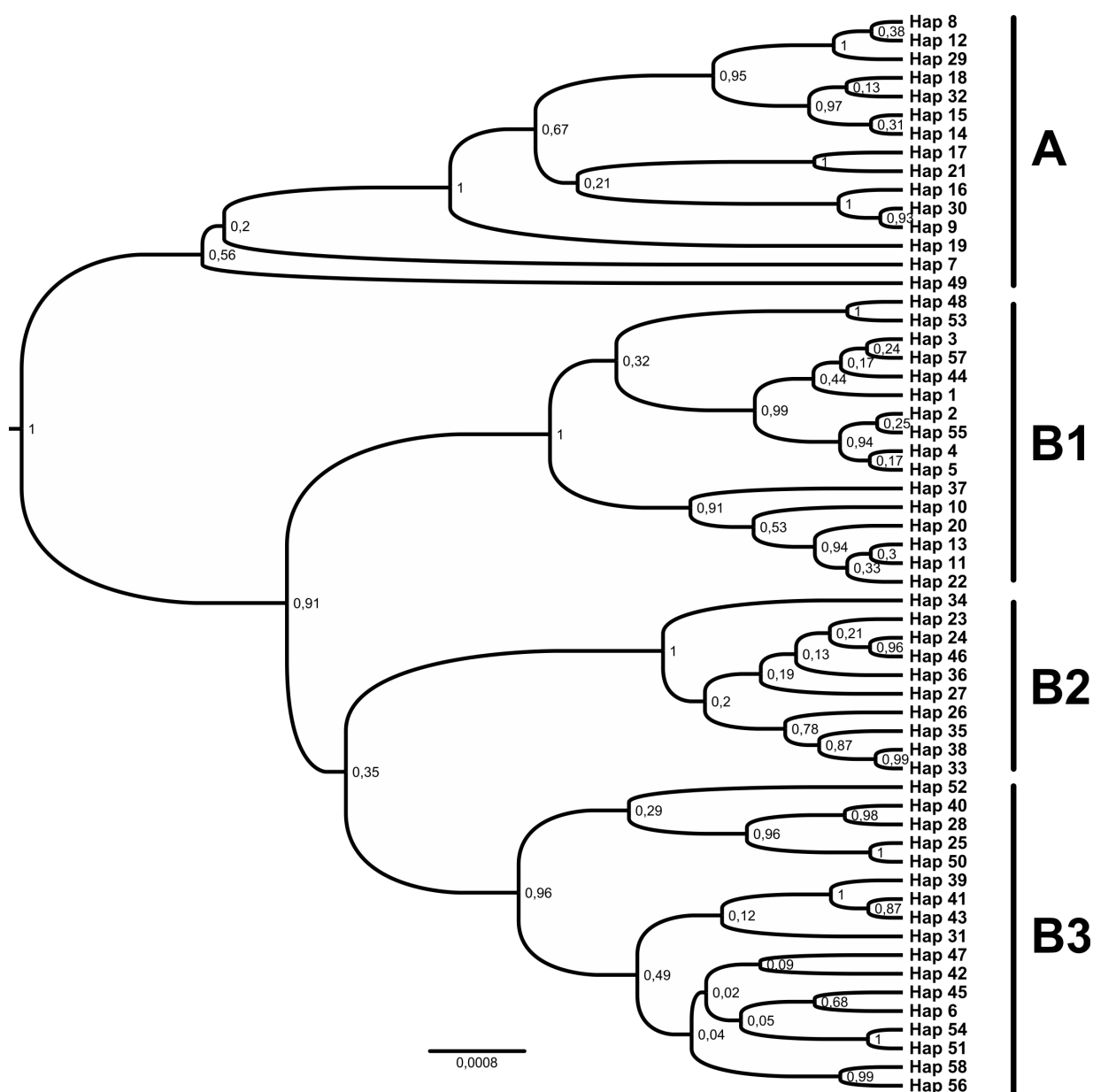


Figura 3.12: Relaciones filogenéticas entre los haplotipos de *Physalaemus fernandezae* recuperadas bajo inferencia bayesiana. Se recuperan dos linajes (A y B) y dentro del linaje B los sublinajes B1, B2 y B3. En los nodos se indica la medida de soporte, la *probabilidad posterior* del nodo. La escala representa cantidad de sustituciones por sitio.

El linaje A está compuesto por haplotipos que se distribuyen principalmente en las poblaciones del norte, localidades de “Punta Lara”, “La Balandra”, “Punta Indio”, “Chascomús” y “Las Flores”, y también tiene un representante (H49) en la población de “Mar de Cobo”, sin embargo, el linaje no fue hallado en ninguna población intermedia. El haplotipo H49 pre-

senta 6 autopomorfías y se recupera en la base del linaje A, es posible que sea un haplotipo relictual y/o de poca frecuencia. El linaje B es el más inclusivo, exceptuando la población de “La Balandra”, se distribuye en toda el área muestreada. Dentro de este linaje se pueden diferenciar tres sublinajes. El sublinaje B1 presenta un rango geográfico más amplio, se encuentra en las poblaciones del norte (“Punta Lara” y “Punta Indio”), en una población del oeste (“Daireux”) y en la población más sur del muestreo (“Energía”). También se destaca que en algunas poblaciones intermedias no está representado. El sublinaje B2 presenta una distribución costera ubicada aproximadamente a la altura de la bahía de Samborombón (“Chascomús”, “Dolores”, “Gral Conesa” y “Pinamar”). El linaje B3 fue encontrado en 9 poblaciones de las 13 muestreadas, es decir, en todas las poblaciones exceptuando “Dolores”, “Chascomús”, “Punta Lara” y “Punta Indio”.

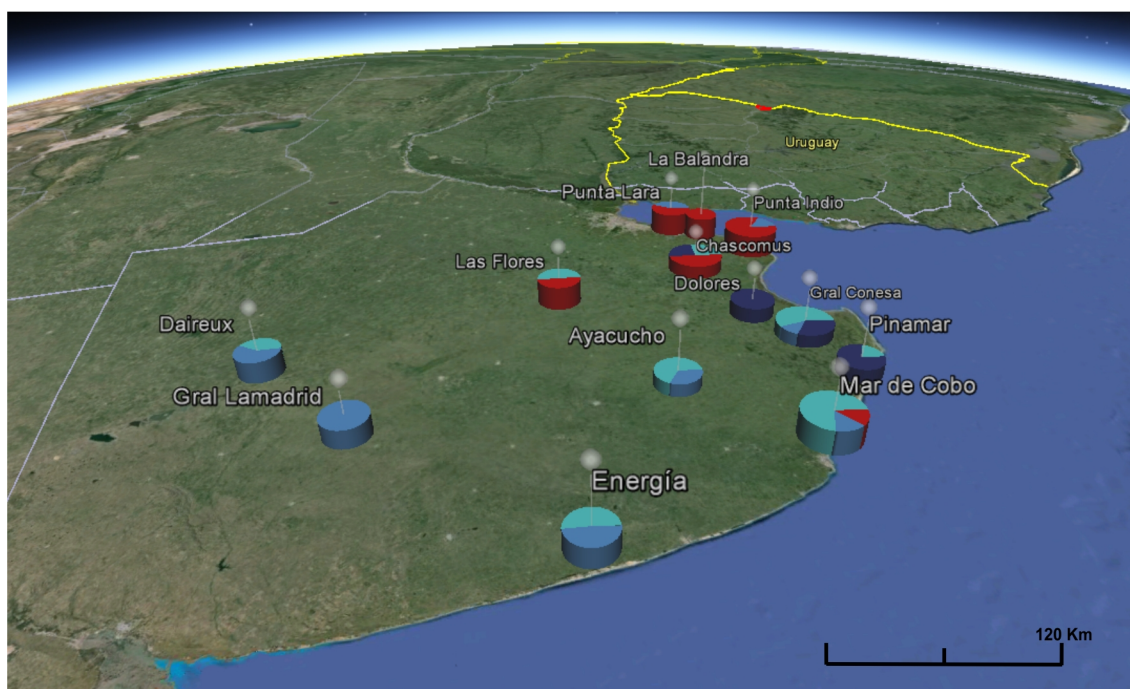


Figura 3.13: Distribución geográfica de los linajes recuperados en el análisis filogenético. El tamaño del gráfico de torta es relativo a la cantidad de haplotipos obtenidos en cada población. Con rojo se marca el linaje A, con azul el sublinaje B1, con azul oscuro el B2 y con celeste el B3.

En la Figura 3.13 se presenta un esquema de la distribución de los linajes de *P. fernandezae*, los gráficos de torta se ubican en las poblaciones muestreadas y su tamaño hace referencia a la cantidad de haplotipos encontrados en cada una de ellas. Con rojo se representa al linaje A y con colores azules al linaje B. Como se puede observar la mayor parte de

las poblaciones tiene representantes de dos o más linajes. Sólo tres poblaciones presentaron individuos pertenecientes a un sólo haplogrupo: la población de “La Balandra” al haplogrupo A, la población de “Gral La Madrid” al haplogrupo B1 y las población de “Gral Conesa” al haplogrupo B2 . Este resultado muestra que los diferentes linajes que componen a *P. fernandezae* no se corresponden con áreas geográficas muy definidas. Algunos de estos linajes tienen la mayor parte de sus haplotipos compartidos entre poblaciones adyacentes, pero de manera general los linajes superponen su distribución espacial.

Red de haplotipos

Los grupos obtenidos con la red de haplotipos son totalmente congruentes con lo recuperado en el árbol. En la red completa no se diferencia ningún haplotipo muy frecuente y ampliamente distribuido, su topología general sugiere estabilidad demográfica. A su vez, dentro de cada linaje y/o sublinaje las topologías también muestran una estabilidad demográfica. De la misma manera que lo observado en el mapa de distribución de los linajes, en la red se puede observar cómo cada linaje presenta componentes esparcidos por casi todas las poblaciones. Esto muestra nuevamente que existe un gran solapamiento espacial de los linajes, pero la red permite visualizar que los haplotipos compartidos por dos o más poblaciones son relativamente pocos.

En la red se observa que el linaje A se separa de todo el linaje B por sólo tres pasos mutacionales. El grupo se compone por 15 haplotipos que se distribuyen predominantemente en las poblaciones del norte (“Punta Lara”, “Punta Indio”, “Chascomús” y “La Balandra”). Dentro del grupo también fueron obtenidos dos haplotipos divergentes (H7 y H49) que se encuentran en las localidades de “Las Flores” y “Mar de Cobo”. La mayor divergencia dentro del linaje es de 19 pasos mutacionales y esta se da entre los haplotipos H7 y H30, el primero de ellos fue encontrado en “Las Flores” y el haplotipo H30 en “Chascomús”. Los dos haplotipos más frecuentes son el haplotipo H9, encontrado únicamente en “Punta Lara”, y el haplotipo H8 compartido entre las poblaciones de “Chascomús” y “Punta Lara”.

El linaje B puede ser subdividido en B1, B2 y B3. En el árbol, el haplogrupo B1 fue obtenido como hermano de B2 + B3; en la red se separa por 10 pasos mutacionales del grupo B2 y por tres pasos del linaje B3. Estas distancias son mayores o iguales a la obtenida entre los linajes A y B, pero la distancia genética no siempre refleja una relación evolutiva.

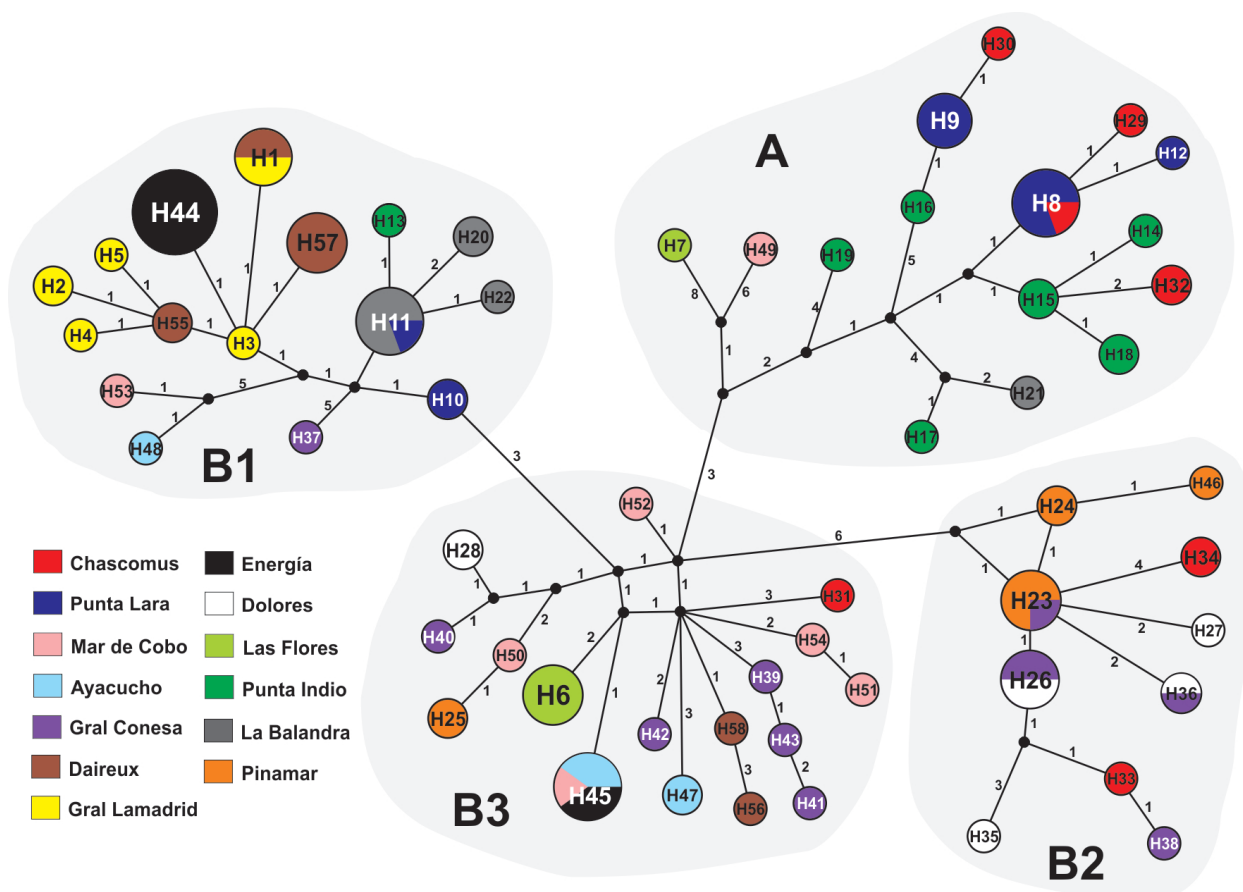


Figura 3.14: Red de haplotipos de *Physalaemus fernandezae*. La sigla dentro de cada esfera identifica cada haplotipo, el tamaño es relativo a la frecuencia del haplotipo y con el color se hace referencia a la población donde fue hallado. Los números ubicados en las ramas que conectan los haplotipos indican la cantidad de pasos mutacionales. Los círculos negros entre las ramas hacen referencia a haplotipos hipotéticos (no muestreados o extintos). En gris se remarcan las agrupaciones obtenidas.

El sublinaje B1 está compuesto por 16 haplotipos, que exceptuando un grupo compuesto por los haplotipos H48 + H53, presentan poca divergencia entre ellos. El haplotipo H37 (“Gral Conesa”) y el grupo H48 + H53 son los más divergentes y se distribuyen en localidades cercanas entre sí (“Ayacucho” y “Mar de Cobo”). En cuanto a su distribución geográfica, exceptuando los haplotipos H37, H48 y H53, se observa que el grupo refleja una conexión entre la población del sur (“Energía”), las del oeste (“Gral La Madrid” y “Daireux”) y las del norte sobre la costa (“Punata Lara”, “La Balandra” y “Punta Indio”). Únicamente se comparten haplotipos entre “Daireux”–“Gral La Madrid” y “Punta Lara”–“La Balandra”. Los haplotipos más frecuentes son: el haplotipo H11 compartido entre “Punta Lara”–“La Balandra” y el haplotipo H44 que es exclusivo de la localidad de “Energía”.

El sublinaje B2 es el que menos cantidad de haplotipos mostró ($n=10$), y su distribución geográfica es la más restringida. Se encuentra en poblaciones costeras de la zona centro de la distribución de la especie (“Chascomús”, “Dolores”, “Gral Conesa” y “Pinamar”). Dentro del sublinaje B2 se distinguen haplotipos frecuentes (H23, H26 y H36) que son compartidos entre al menos dos poblaciones cercanas, los grupos “Gral Conesa”–“Pinamar” y “Gral Conesa”–“Dolores”. La máxima divergencia dentro de este grupo es de 9 pasos mutacionales entre los haplotipos H34 y H35.

El sublinaje B3 esta representado por 17 haplotipos y presenta una amplia distribución, fue hallado en las localidades del sur, el oeste y el centro hasta su límite norte en la población de “Chascomús”. Del linaje B3 el único haplotipo compartido es el H45, presente en tres poblaciones: “Energía”, “Ayacucho” y “Mar de Cobo”. El haplotipo H6 fue hallado en cuatro ejemplares, pero su distribución está restringida a la población de “Las Flores”. La máxima divergencia dentro del linaje es de 12 pasos mutacionales entre los haplotipos H25 y H41.

Como se observa en la red, la única población que presenta componentes de un solo linaje (B1) es “Gral La Madrid”. El resto de las poblaciones están compuestas por representantes de distintos haplogrupos. Las poblaciones más parafiléticas son “Chascomús”, “Mar de Cobo” y “Gral Conesa”. En las dos primeras se encuentran representantes de los linajes A, B2 y B3. La población de “Gral Conesa” está compuesta por haplotipos de los linajes B1, B2 y B3. El resto de las poblaciones se componen por combinación de dos haplogrupos. El resultado de la red evidencia un solapamiento espacial entre los linajes, resultado congruente con el mapa de distribución espacial de los clados (Figura 3.13).

Análisis Molecular de la Varianza en *P. fernandezae*

En la tabla de *Fst* pareados (Tabla 3.11) se puede observar algunos patrones a nivel regional. Las poblaciones del sur y sudoeste parecen tener algún grado de conexión, y aunque las poblaciones de “Gral La Madrid” y “Energía” mostraron diferencias significativas entre ellas, ninguna presentó diferencias con “Daireux”, y a su vez, todas ellas se diferencian del resto de las poblaciones examinadas. Al norte del Río Salado fueron muestradas cuatro poblaciones, “Punta Lara”, “Punta Indio” y “Chascomús” no mostraron diferencias entre ellas, pero a pesar de su ubicación geográfica, “La Balandra” mostró diferencias significativas con las otras tres poblaciones. En la región central de la distribución, al sur del Río Salado, se ob-

	Las Flores	Dolores	Gral Conesa	Pinamar	Mar de Cobo	Ayacucho	Chascomús	Energía	La Balandra	Punta Indio	Punta Lara	Daireux	Gral Lamadrid
Las Flores	*	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Dolores	0,397	*	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Gral Conesa	0,254	0,008	*	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Pinamar	0,509	0,012	0,085	*	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Mar de Cobo	0,134	0,249	0,124	0,294	*	-	-	+	+	+	+	+	+
Ayacucho	0,117	0,344	0,184	0,426	-0,027	*	-	+	+	+	+	+	+
Chascomús	0,199	0,168	0,144	0,224	0,159	0,210	*	+	+	-	-	+	+
Energía	0,563	0,541	0,396	0,603	0,330	0,430	0,427	*	+	+	+	-	+
La Balandra	0,463	0,463	0,359	0,537	0,300	0,384	0,361	0,364	*	+	+	+	+
Punta Indio	0,368	0,501	0,432	0,564	0,346	0,421	0,089	0,598	0,503	*	-	+	+
Punta Lara	0,349	0,443	0,374	0,504	0,279	0,341	0,075	0,502	0,404	0,040	*	+	+
Daireux	0,510	0,492	0,333	0,546	0,256	0,363	0,373	0,161	0,334	0,553	0,456	*	-
Gral Lamadrid	0,660	0,563	0,420	0,643	0,422	0,564	0,427	0,295	0,390	0,621	0,525	0,142	*

Tabla 3.11: Tabla de *F_{st}* pareados y su significancia en las poblaciones de *P. fernandezae*, con el símbolo (+) se muestran los resultados significativos y con (-) los no significativos. El nivel de significancia utilizado fue de 0,01.

3. Resultados

servó que la población de “Mar de Cobo” no se diferencia de “Las Flores”, “Dolores”, “Gral Conesa” ni de “Ayacucho”. Tampoco se encontraron diferencias entre los grupos compuestos por “Las Flores”–“Ayacucho”–“Mar de Cobo” y “Gral Conesa”–“Dolores”–“Pinamar”–“Mar de Cobo”–“Ayacucho”. Tanto en la red de haplotipos como en el gráfico de distribución de los linajes, se observó un solapamiento de linajes en el área central de la distribución de la especie. Respecto a la población de “Chascomús” parece jugar un rol de conexión entre el norte y el sur del Río Salado. La población se ubica al norte del Río Salado pero no se diferencia con las poblaciones del norte ni con las poblaciones de “Gral Conesa”, “Ayacucho”, “Las Flores”, “Dolores”, “Mar de Cobo” y “Pinamar”, todas ubicadas al sur del río.

Agrupaciones	Fuente de variación		
	entre grupos (Φ_{ct})	dentro de grupos (Φ_{sc})	dentro de población (Φ_{st})
[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]	—	62,80 % (—)	37,19 % (0,37198*)
[1, 2, 11]			
[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13]	18,98 % (0,18979**)	25,24 % (0,31157*)	55,78 % (0,44222*)
[3, 4, 5, 7]			
[6, 8, 9, 10, 12, 13]	24,23 % (0,24027*)	17,50 % (0,23034*)	58,47 % (0,41527*)
[1, 2, 11]			
[3, 4, 5]			
[6, 8, 9, 10, 12, 13]	25,99 % (0,25988*)	18,77 % (0,25367*)	55,24 % (0,44763*)
[1, 2, 11]			
[A1][B1, B2, B3]	20,27 % (0,20276)	43,88 % (0,55049*)	35,83 % (0,64164*)

Tabla 3.12: Análisis de la Varianza Molecular para diferentes grupos de *Physalaemus fernandezae*. Con números se referencia a las poblaciones (1) Gral La Madrid, (2) Daireux, (3) Punta Lara, (4) Punta Indio, (5) La Balandra, (6) Las Flores, (7) Chascomús, (8) Dolores, (9) Gral Conesa, (10) Pinamar, (11) Energía, (12) Mar de Cobo y (13) Ayacucho. La quinta agrupación corresponde a los linajes. ** $P < 0,05$, * $P < 0,01$.

La estructuración fue evaluada mediante el análisis molecular de la varianza (AMOVA), y para ello se realizaron cinco pruebas. La primer prueba se realizó sin presentar niveles je-

rárquicos. La segunda prueba fue basada en la tabla de *Fst*, evalúa dos grupos de poblaciones, uno con las poblaciones de la región sur y oeste (“Energía”, “Gral La Madrid” y “Daireux”) y otro que comprende al resto de las poblaciones del centro y norte. En la tercer prueba se plantearon agrupaciones regionales, se definió un grupo de poblaciones ubicadas al norte del Río Salado (“Punta Lara”, “Punta Indio”, “La Balandra” y “Chascomús”), un segundo grupo que reúne las poblaciones del centro (“Ayacucho”, “Las Flores”, “Gral Conesa”, “Pinamar”, “Dolores” y “Mar de Cobo”) y un tercer grupo compuesto por las poblaciones del sur y del oeste (“Energía”, “Gral La Madrid” y “Daireux”). La cuarta forma de agrupar fue muy similar a la segunda, la diferencia es que se elimina a la población de “Chascomús”; con esta prueba se pretende evaluar si ésta población funciona como nexo entre el norte y sur del Río Salado. La quinta forma de agrupamiento fue utilizando el criterio genealógico, se contemplaron los dos linajes principales recuperados en el análisis filogenético (Tabla 3.12).

Al realizar un AMOVA sin presentar niveles jerárquicos se obtuvo un *Fst* de 0,37 ($p < 0,01$) reflejando una baja estructuración entre las poblaciones. A excepción del criterio filogenético, donde la agrupación no está soportada estadísticamente, todas las agrupaciones realizadas muestran señal de estructura. La tercera manera de agrupar, donde se definió un grupo al norte del Río Salado, uno al centro de la distribución y otro al sur-sudoeste, mostró un Φ_{ct} de 0,2423. Pero la cuarta agrupación, al excluir la población de “Chascomús”, marcó mayor estructura entre grupos. A pesar que ninguna de las pruebas mostró una fuerte estructura entre grupos, la cuarta indica que posiblemente “Chascomús” esté actuando como nexo entre las poblaciones del norte del Río Salado y las del centro de la distribución de la especie. En la red de haplotipos se pudo observar que la distribución de los linajes no respeta un patrón geográfico muy marcado, pero ello no quiere decir que no exista ningún grado de estructuración. El análisis de AMOVA tiene en cuenta, además de la distancia entre los haplotipos, la frecuencia de los haplotipos en cada partición considerada. Es evidente que la frecuencia de los haplotipos está mostrando un cierto grado de estructura que no pudo ser visualizada en la red de haplotipos ni el árbol filogenético.

Aislamiento por distancia

Cuando se evaluó el aislamiento por distancia de las poblaciones de *P. henselii*, la geografía de Uruguay permitió tomar distancias planteando dos hipótesis alternativas. En el mismo

3. Resultados

sentido se buscó la forma de plantear diferentes hipótesis en *P. fernandezae*, pero la geografía de la provincia de Buenos Aires no permitió tomar las distancias con un criterio alternativo a las líneas rectas. En la distribución de la especie (Figura 3.3) las únicas “barreras a esquivar” son los ríos, pero al revisar las cuencas de los ríos de Buenos Aires detallados por Frenguelli (1956) se observa, por ejemplo, que para esquivar la cuenca de Río Salado y poder conectar las poblaciones ubicadas al norte y sur del mismo, se deben trazar caminos que implican alejarse de la distribución de la especie. Por éste motivo, la única forma de tomar las distancias geográficas entre las poblaciones fue en línea recta.

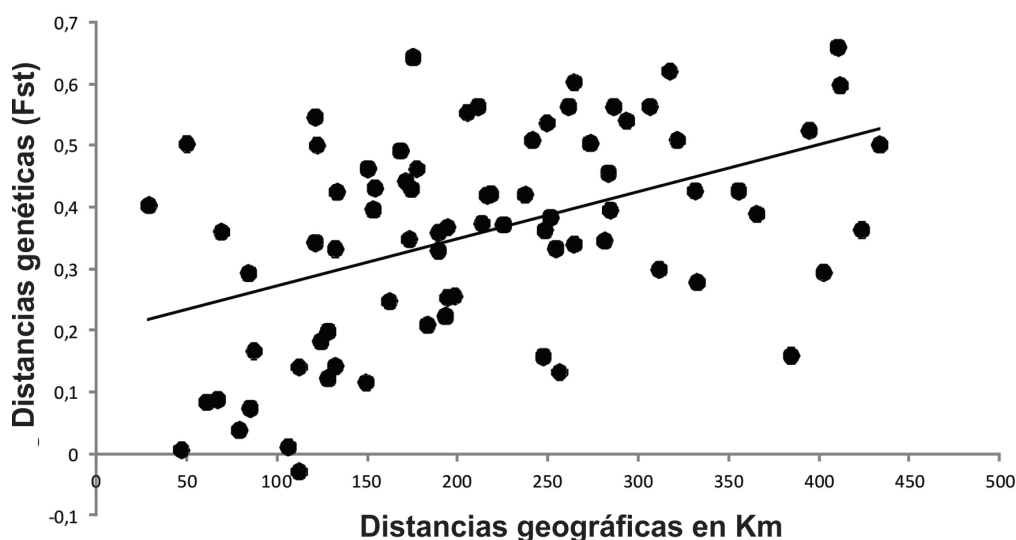


Figura 3.15: Test de Mantel en *Physalaemus fernandezae*.

En la Figura 3.15 se muestra la correlación entre las dos variables. Como se puede apreciar en el gráfico, existe una cierta relación entre los *Fst* y las distancias geográficas, pero esta correlación no es muy marcada. El coeficiente de Pearson dió un valor medio o bajo ($r=0,42$), con una buena significancia de $p < 0,01$. Este es otro resultado que muestra la débil estructuración geográfica que presenta la especie.

3.4.3. Historia demográfica

Al igual que en *P. henselii*, aquí se presentan los resultados de los test de demografía y los valores de la diversidad genética agrupando los haplotipos en base a los linajes obtenidos en la reconstrucción filogenética. En los linajes y sublinajes recuperados para la especie

(referidos como A, B1, B2 y B3) se observa una alta diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π). Pero para la totalidad de las muestras la diversidad nucleotídica (π) es un poco más moderada que cuando se subdivide en linajes. El linaje A es el que presenta el mayor valor de diversidad nucleotídica, aunque hay que contemplar que dentro del linaje A existen haplotipos divergentes, los haplotipos H7 y H49.

Linaje	k	$Hd \pm sd$	π	D de Tajima's	F_s de Fu's	rg	R_2
A	14	0,937+0,033	0,00497	-1,34211	-2,2666	0,0267	0,0829
B1	16	0,919+ 0,025	0,00270	-1,31968	-4,8201	0,0739	0,0708
B2	9	0,865+0,056	0,00305	-1,80969	-0,6785	0,0169**	0,1208
B3	17	0,954+0,024	0,00394	-1,15562	-5,9239**	0,0029	0,0833*
Todos	57	0,980+0,004	0,00739	-1,44701	-27,6577*	0,0085	0,0526

Tabla 3.13: Diversidad genética y tests de neutralidad en los diferentes linajes de *Physalaemus fernandezae*. Para cada uno se muestra la cantidad de haplotipos (k), la diversidad haplotípica con su desvío estándar ($Hd \pm sd$) y la diversidad nucleotídica (π). En los estadísticos se marcan los valores de significancia: un (*) para $P < 0,01$ y dos (**) para $P < 0,02$.

Los resultados de los estadísticos para la totalidad de las muestras presentan algunas contradicciones. El D de Tajima's y el R_2 dieron valores no significativos, ambos sugieren estabilidad demográfica, pero el valor de rg , bajo y no significativo, y el F_s de Fu's sugieren una expansión demográfica.

En el linaje A únicamente el rg podría estar detectando un proceso de expansión demográfica, mientras que en los sublinajes B1 y B2 todos los estadísticos sugieren estabilidad demográfica. Respecto al sublinaje B3 los valores de F_s de Fu's, rg y R_2 apoyan que el sublinaje se encuentra en expansión demográfica, pero el valor D de Tajima's no sugiere el mismo proceso (Tabla 3.13).

La distribución de diferencias pareadas para el total de las muestras genera una curva errática con un promedio de diferencias de 10,519 pasos mutacionales; la distribución se asemeja a lo esperado bajo un modelo de expansión, pero está desplazada hacia la derecha (Figura 3.16). Los resultados obtenidos con los estadísticos F_s y rg apoyaron un proceso de expansión demográfica, pero la distribución de las diferencias pareadas, el R_2 y la D de Tajima's

3. Resultados

mostraron estabilidad demográfica. En la misma figura se puede observar una distribución mucho más errática que se generó con las muestras del linaje A, para este grupo únicamente el estadístico rg mostró un debil indicio de expansión poblacional reciente. El promedio de diferencias dentro del linaje A fue de 7,079.

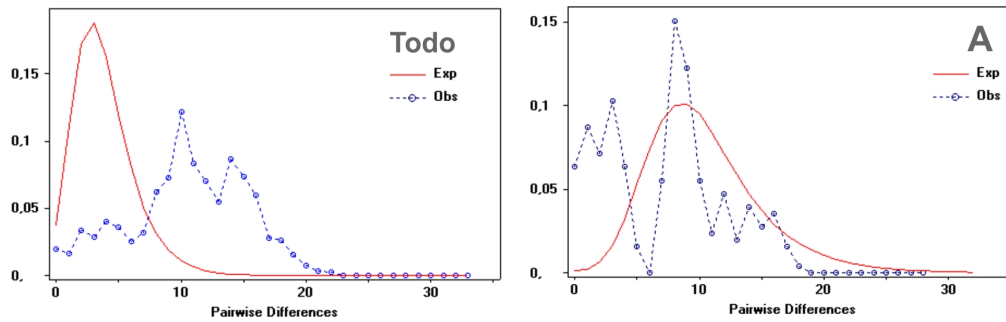


Figura 3.16: Distribución de las diferencias pareadas en todas las muestras de *Physalaemus fernandezae* (derecha) y en el linaje A (izquierda). Con líneas punteadas se indica la distribución de los datos y con línea roja continua la distribución esperada bajo el modelo de expansión demográfica.

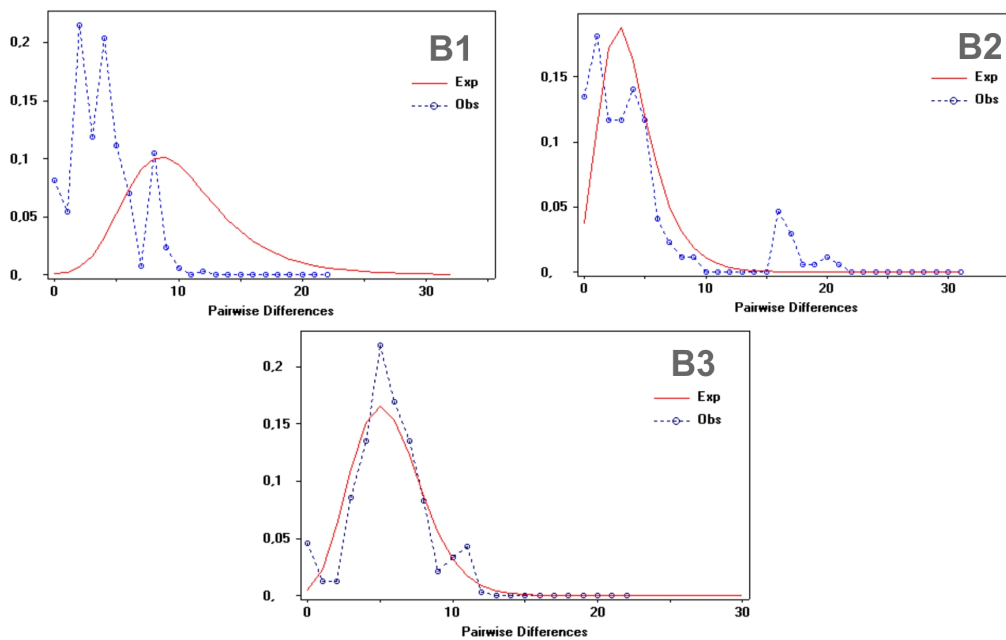


Figura 3.17: Distribución de las diferencias pareadas de los sublinajes B1, B2 y B3 de *Physalaemus fernandezae*. Con líneas punteadas se indica la distribución de los datos y con línea roja continua la distribución esperada bajo el modelo de expansión demográfica.

En la Figura 3.17 se muestran las distribuciones generadas con los linajes B1, B2 y B3. Para los linajes B1 y B2 se observan distribuciones erráticas, lo cual es congruente con los

resultados de los diferentes estadísticos; todos los análisis muestran que se encuentran en estabilidad demográfica. El sublinaje B3 muestra una distribución que se ajusta a la esperada bajo un modelo de expansión demográfica reciente, sólo la D de Tajima's no mostró estabilidad, pero los estadísticos de rg , F_s y R_2 apoyan lo observado en la distribución de las diferencias pareadas: expansión demográfica reciente. El promedio de pasos mutacionales dentro de cada sublinaje fue de 3,841 para el B1, 4,339 para el B2 y de 5,6 para el B3.

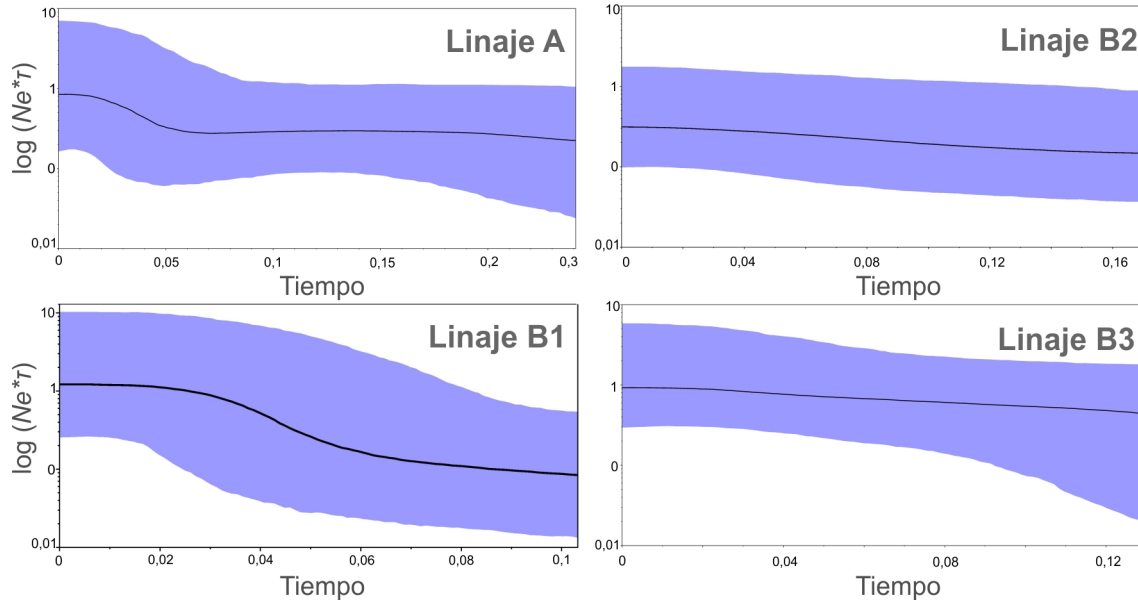


Figura 3.18: Skyline-plot bayesiano de cada linaje de *Physalaemus fernandezae*. En los gráficos se muestra con una línea negra la media del tamaño efectivo poblacional y en azul los límites de confianza al 95 %. En la abscisa se indica el tiempo en millones de años y en la ordenada el $\log (Ne*\tau)$, donde Ne es el tamaño efectivo poblacional y τ es el tiempo generacional.

Los skyline-plots bayesianos muestran que los linajes A y B1 tuvieron una expansión demográfica en el pasado, hace ~40 mil años, pero que en la actualidad ambos linajes se mantienen estables. En los linajes B2 y B3 no se observa un crecimiento demográfico abrupto. Con respecto al linaje B2, el resultado de estabilidad es concordante con los resultados obtenidos por los estadísticos. Pero la estabilidad demográfica sugerida por el skyline-plots bayesiano para el linaje B3 es contradictoria con casi todos los resultados obtenidos con los estadísticos.

El análisis de filogeografía bayesiana propone que el centro de origen de *Physalaemus fernandezae* está situado al suroeste de la bahía de Samborombón, provincia de Buenos Aires (área azul oscura de la Figura 3.19A). Posteriormente a su origen, en una primera etapa,

3. Resultados

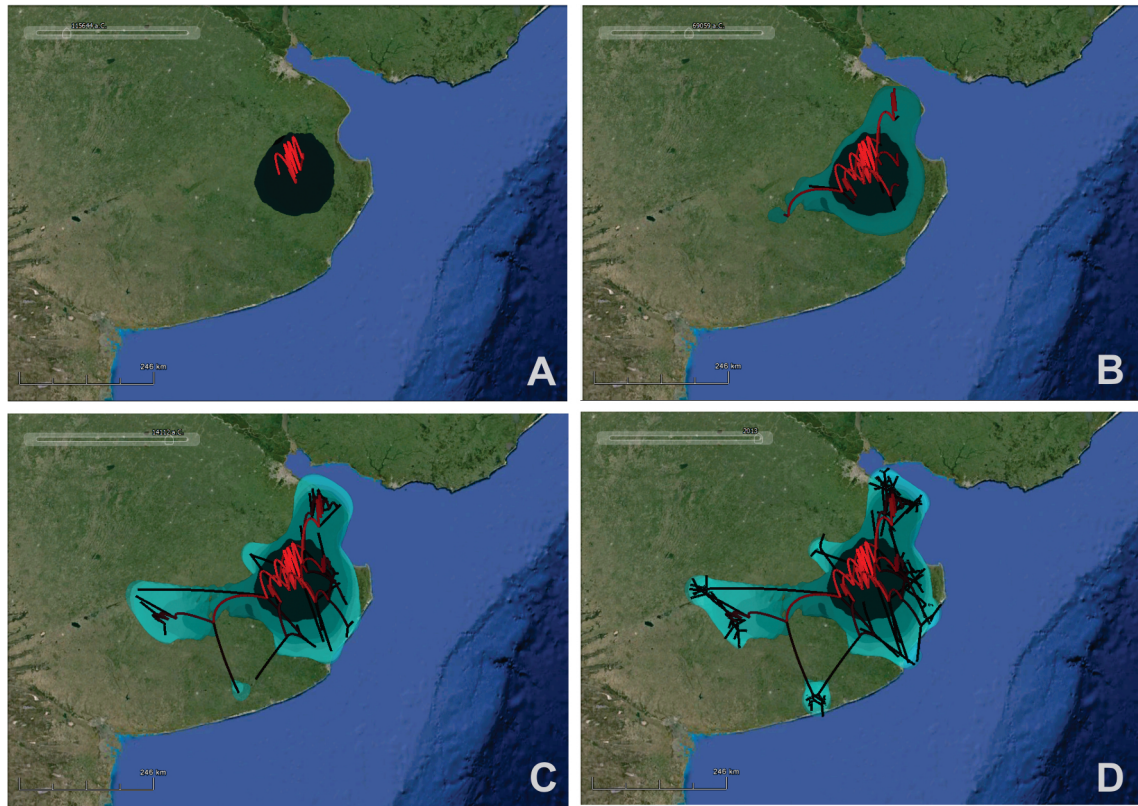


Figura 3.19: Difusión de *Physalaemus fernandezae* a través del tiempo. Reconstrucción bayesiana, en A se representa el centro de origen, en B y C dos momentos posteriores y en D el presente. El árbol de máxima credibilidad obtenido mediante el análisis de filogeografía bayesiana se encuentra representado sobre el terreno. En rojo se representan las ramas más basales del árbol y se van oscureciendo hacia las ramas más derivadas. Las regiones azules, sobre el terreno, representan la ubicación geográfica de las ramas con un 80 % de credibilidad. El azul oscuro se corresponde con las más basales y se aclara hacia las ramas más derivadas

la especie toma dos rutas principales de dispersión. Una de ellas se dirige hacia el sudoeste y la otra hacia el noreste, atravesando lo que hoy conocemos como el Río Salado (Figura 3.19B). En la Figura 3.19C se puede observar que la especie ya ocupaba la misma área de distribución geográfica que en la actualidad. Como fue observado en otros análisis, a las poblaciones de “Energía” y “Daireux” llegan individuos de dos linajes. También se hace evidente que desde las poblaciones del norte del Río Salado existió un retorno hacia la región de origen, o al menos hacia el sur del río. En esta etapa también existe un desplazamiento de la especie hacia zonas costeras, con múltiples migraciones desde su centro de origen. La Figura 3.19D pertenece al presente, allí se puede destacar la interacción entre pares de poblaciones

“Daireux”–“Gral La Madrid” y “Punta Lara”–“Punta Indio”. El análisis revela de forma clara la interacción entre las poblaciones y de alguna manera explica la escasa estructura filogeográfica encontrada por otros análisis realizados. La historia de dispersión propuesta por el análisis es congruente con la poca estructura obtenida por el AMOVA y el análisis de aislamiento por distancia. La composición parafilética de casi todas las poblaciones también se evidencia en la red de haplotipos y en la distribución de linajes (Figura 3.13).

CAPÍTULO 4

Discusión

4.1. Distribución

A partir de la revisión de ejemplares depositados en diferentes colecciones herpetológicas, en este trabajo se presenta en mayor detalle la distribución geográfica de *P. henselii* y *P. fernandezae*. Barrio (1964) cita a *P. henselii* para un área geográfica que abarca el sur del estado de Santa Catarina, la mitad este del estado de Rio Grande do Sul y la República Oriental del Uruguay, una franja costera al sur de Uruguay y algunas localidades de la provincia de Entre Ríos en Argentina. También menciona un ejemplar procedente de Asunción del Paraguay (Barrio, 1964). Para el extremo noreste de la distribución (Santa Catarina), Barrio no especifica material verificable, pero en un trabajo posterior, el mismo autor da a conocer los primeros ejemplares de referencia para Santa Catarina (Barrio, 1967). En este trabajo se reporta otra localidad para el estado de Santa Catarina, Brasil, en base a un ejemplar depositado en el Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica (Hotel Ravenac, Laguna, SC; MCN-11970). Éstas localidades son, hasta el momento, el extremo norte de la distribución de *P. henselii* y, al no encontrar más material de localidades hacia el norte, probablemente la especie no se extienda mucho más allá de estas localidades. En el estado de Rio Grande do Sul la colección del MCN también aportó valiosa información, agregando algunas localidades a

las mencionadas por Barrio (1964; 1967) en la región oeste del estado y confirmando que su distribución abarca casi la totalidad de Rio Grande do Sul. En Uruguay se confirman los registros costeros ya mencionados por Barrio (1964) y la ampliación hacia el oeste y noroeste presentado por Núñez et al. (2004). Según Barrio (1964), *P. henselii* se distribuye en la Isla Martín García (provincia de Buenos Aires) y en la provincia de Entre Ríos, Argentina. Para esta última provincia Barrio registró ejemplares en las cercanías de Concepción del Uruguay y Gualeguaychú. En adición a la población mencionada para la Isla Martín García, existe otro ejemplar depositado en el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (MACN-10062). En este trabajo se obtuvieron ejemplares provenientes del Parque Nacional “El Palmar”, confirmando nuevos registros en la provincia. Este último registro no fue mencionado en la revisión de Anfibios y Reptiles del Parque Nacional “El Palmar” de Gallardo (1982), pero sí fue hallado material de esta localidad depositado en el Museo de La Plata (MLP.A-3009-10). En este estudio no pudo ser revisada la colección del Museo Nacional de Rio de Janeiro, donde se encuentra depositado el ejemplar que Barrio (1964) mencionó para Asunción del Paraguay (MN-486), pero en una revisión actualizada de los anfibios de Paraguay, Brusquetti & Lavilla (2006), comentan que ese material se encuentra en mal estado de conservación lo que hace imposible su identificación específica, motivo por el cual excluyen la especie de Paraguay.

Con respecto a *P. fernandezae*, su distribución está representada casi por completo en la provincia de Buenos Aires, con algunos registros citados para Uruguay (Barrio, 1964; Gallardo, 1965). Barrio (1964) menciona que también se encuentra en la provincia de Entre Ríos y probablemente en el sur de Santa Fe, pero su lista de material estudiado se presta a confusión. El sur de Santa Fe es mencionada por Barrio como un área probable de distribución pero sin citar material de referencia. Para la provincia de Entre Ríos cita dos ejemplares depositados en el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, uno de ellos, el ejemplar MACN-1734, no fue hallado al revisar la colección, y el ejemplar MACN-1243 citado para “Zelaya (Concordia)”, puede haber sido una confusión, dado que no existe una localidad llamada “Zelaya” en las cercanías de Concordia y tampoco en la provincia de Entre Ríos. En los libros de entradas del MACN bajo este número figuran unos ejemplares pertenecientes al género *Pseudopaludicola*. Barrio (1965) hace una revisión del género *Physalaemus* en Argentina y cuando describe la distribución de *P. fernandezae* no vuelve a mencionar su

presencia en la provincia de Entre Ríos. Considerando este último punto y que en la revisión realizada no fue hallado ningún ejemplar con procedencia de Entre Ríos ni de Santa Fe, la distribución de *P. fernandezae* en Argentina está restringida únicamente a la provincia de Buenos Aires. En Uruguay *P. fernandezae* fue registrada para unas pocas localidades. Barrio (1964) describe la actividad reproductiva de *P. henselii* y *P. fernandezae* en simpatría para la Barra de Santa Lucía, Santiago Vázquez, Uruguay. El material de esta localidad se encuentra depositado en la colección CENAI (CENAI-122, actualmente alojada en el MACN). En el mismo trabajo Barrio también reporta ejemplares para el Arroyo Solís, entre Pando y Punta del Este (CENAI-155). Núñez et al. (2004) citan a esta especie para la localidad de Cerro Colorado, departamento Florida y también para Santiago Vázquez (MNHN-1164 y MNHN-1165, respectivamente). A pesar de la existencia de estos ejemplares, es muy llamativo que desde principios de los años '60 no se volvió a registrar la especie en territorio uruguayo. En la categorización de Anfibios de Uruguay se remarca que no se ingresa material perteneciente a *P. fernandezae* en una colección uruguaya desde 1962 (Maneyro & Langone, 2001). Desde hace más de 10 años que la localidad de Santiago Vázquez, donde la especie era registrada comúnmente, es monitoreada sin nuevos registros de *P. fernandezae* y tampoco de *P. henselii* (Borteiro & Kolenc, com. pers.). En esta localidad también eran observadas las especies *Ceratophrys ornata* y *Pleurodema bibroni*, que en la actualidad ya no se encuentran. Este fenómeno debería ser estudiado en detalle dado que los ambientes no parecen haber sufrido grandes modificaciones. Por lo tanto, en base a esta revisión de material de *P. fernandezae*, se propone que hasta que no sea confirmada su presencia en Uruguay, la especie debe ser considerada como un endemismo de la provincia de Buenos Aires. Su área de distribución se extiende hacia el oeste en casi todo su rango latitudinal. Finalmente hay que aclarar que los mapas de distribución de Lavilla & Langone (2004), presentan localidades que deberían ser actualmente removidas: Rivera en Uruguay y la provincia de Entre Ríos en Argentina.

4.2. Relaciones interespecíficas

Cannatella & Duellman (1984) cuestionan la monofilia del género *Physalaemus*, pero todos los análisis moleculares realizados hasta el momento (Pyron & Wiens, 2011; Faivovich et al., 2012; Fouquet et al., 2013; este trabajo) apoyan su monofilia. El género *Physalaemus* ha sido relacionado a *Pseudopaludicola* (Lynch, 1971; Heyer 1974; 1975) y ambos con *Edalorhina* y *Pleurodema*. Estos 4 géneros junto a *Engystomops* componen la subfamilia Leiuperinae, dentro de Leptodactylidae (Pyron & Wiens, 2011). En este trabajo se realizaron análisis filogenéticos de máxima parsimonia y bayesianos, los cuales presentaron gran congruencia con la excepción de la posición del género *Edalorhina*. El análisis de máxima parsimonia recupera a *Edalorhina* como hermano de *Engystomops* y ambos como clado hermano de *Physalaemus*. Esta relación es congruente con otros análisis de máxima parsimonia (Faivovich et al., 2012; Fouquet et al., 2013). En cambio el análisis bayesiano recupera a *Edalorhina* como hermano de *Engystomops* + *Physalaemus*. Esta relación también fue obtenida por Pyron & Wiens (2011) y Faivovich et al. (2012) en sus análisis bayesianos o de máxima verosimilitud. En los análisis aquí obtenidos el género *Pleurodema* es recuperado como hermano del clado conformado por *Edalorhina* + *Physalameus* + *Engystomops*, resultado también congruente con trabajos previos (Grant et al., 2006; Frost et al., 2006; Pyron & Wiens, 2011; Faivovich et al., 2012; Fouquet et al., 2013). La posición del género *Pseudopaludicola* es controversial: en los análisis filogenéticos de Grant et al. (2006), Pyron & Wiens (2011), Fouquet et al. (2013) y en los resultados obtenidos en este trabajo, *Pseudopaludicola* muestra una posición basal respecto de *Physalaemus* + *Engystomops* + *Edalorhina* + *Pleurodema*, pero sin presentar una buena medida de soporte. Los análisis de Frost et al. (2006), Lourenço et al. (2008) y Faivovich et al. (2012) relacionan a *Pseudopaludicola* con el género *Paratelmatobius*. Hasta el momento no se ha realizado un análisis exhaustivo a fin de dilucidar su posición y por consiguiente, la validez de Leiuperinae como grupo monofilético debe ser tomada con prudencia.

Este trabajo no incluye la totalidad de las especies de *Physalaemus* conocidas y seguramente de ser incluídas, las relaciones intragenéricas presentarán algunos cambios. A pesar de ello se observan diferencias con los trabajos pre-cladísticos (Lynch, 1970; Heyer, 1974; 1975; Nascimento et al., 2005) que son interesantes destacar. Lynch (1970) en su revisión taxonómica del género *Physalaemus*, incluye a los géneros *Engystomops* y *Eupemphix* en sinonimia

con *Physalaemus*, y define cuatro grupos de especies: grupo *P. biligonigerus*, grupo *P. cuvieri*, grupo *P. signifer* y grupo *P. pustulosus*. En su propuesta, las especies *P. fernandezae* y *P. henselii* fueron asignadas al grupo de especies *P. cuvieri*, junto con *P. riograndensis*. El análisis realizado en este trabajo muestra que el grupo *P. cuvieri sensu* Lynch es parafilético, dado que *P. barrioi*, *P. biligonigerus* y *P. santafecinus*, parte de lo que Lynch (1970) denominó grupo *P. biligonigerus*, se anida dentro del grupo de especies *P. cuvieri*. A su vez, *P. nattereri*, también ubicado en el grupo de especies *P. biligonigerus*, es recuperado en otro clado sin presentar relación con éste grupo. El grupo de especies *P. signifer* se recupera parafilético debido a que *P. olfersii* y *P. signifer* se reparten en diferentes clados. Recientemente, Nascimento et al. (2005) realizaron una revisión del género utilizando análisis morfométricos, morfología externa, patrones de color y caracteres osteológicos. Allí revalidan los géneros *Engystomops* (=grupo de especies *P. pustulosus sensu* Lynch) y *Eupemphix*; y definen siete grupos de especies dentro del género *Physalaemus*. La revalidación de *Engystomops* fue apoyada posteriormente con evidencia molecular (Weigt et al., 2005; Ron et al., 2007, Pyron & Wiens, 2011; este estudio). El género monotípico *Eupemphix* es siempre recuperado anidado dentro de *Physalaemus* (Pyron & Wiens, 2011; Faivovich et al., 2012; este trabajo). A pesar de ello, Pyron & Wiens (2011) no discuten este resultado y recién en el trabajo de Faivovich et al. (2012) *Eupemphix* se vuelve a considerar sinónimo “junior” de *Physalaemus*. Nascimento et al. (2005) nominan al grupo de especies *P. henselii* constituido por *P. fernandezae*, *P. henselii* y *P. riograndensis*. El análisis molecular aquí realizado muestra resultados diferentes: *Physalaemus riograndensis* es la especie hermana del clado compuesto por *P. biligonigerus* + *P. santafecinus*. En los árboles de Pyron & Wiens (2011), Faivovich et al. (2012) y Fouquet et al. (2013) esta especie es recuperada como especie hermana de *P. biligonigerus*, aunque estos trabajos no incluyen representantes de *P. fernandezae*, *P. henselii* ni *P. santafecinus*. A pesar de que la posición de *P. riograndensis* como hermana de *P. biligonigerus* + *P. santafecinus* no presenta una buena medida de soporte, sí fue encontrado un buen soporte para el clado más inclusivo, y por este motivo se considera que *P. riograndensis* debe ser removida del grupo de especies *P. henselii sensu* Nascimento et al. (2005). Adicionalmente a los resultados obtenidos con caracteres moleculares, otros estudios basados en la morfología del desarrollo larval (Borteiro & Kolenc, 2007; Vera Candioti et al., 2011) y cariología (Tomatis et al., 2009) no encuentran soporte para el grupo de especies *P. henselii*. La remoción de *P. riograndensis* del

grupo de especies *P. henselii* implicaría una redefinición del grupo y seguramente una nueva definición del grupo de especies al cual sea asociada.

En todos los análisis filogenéticos realizados en este trabajo *P. fernandezae* y *P. henselii* fueron recuperadas como especies hermanas, mostrando siempre el máximo valor de soporte. Este resultado apoya las observaciones morfológicas, etológicas y del desarrollo larval reportadas previamente (Alcalde et al., 2006; Barrio, 1964, 1965; Lobo, 1996; Nascimento et al., 2005; Kolenc et al., 2006; Vera Candioti et al., 2011).

Parker (1927) describe una nueva especie bajo el nombre de *Physalaemus barbouri*, con localidad tipo en las cercanías de la ciudad de La Plata, quedando *P. fernandezae* como una especie restringida al sur de la provincia de Buenos Aires y *P. barbouri* ocupando el norte de Buenos Aires. La identidad de *P. barbouri* fue aclarada por Barrio (1964), donde muestra claramente que es un sinónimo “junior” de *P. fernandezae*. A pesar de esta evidencia, Gallardo (1965; 1974) siguió utilizando el nombre de *P. barbouri* en casi todas sus investigaciones. Los análisis filogenéticos y sobre todo el análisis filogeográfico realizado en este trabajo muestran desde una perspectiva molecular, que *P. barbouri* es sinónimo junior de *P. fernandezae*.

Al no existir registro fósil de *P. fernandezae* y *P. henselii*, la única herramienta disponible para dilucidar su origen y diversificación es el uso de relojes moleculares. Las pruebas aquí realizadas sugieren que la divergencia entre estas dos especies se produjo durante el Mioceno medio, aproximadamente 15 Ma atrás. En el Mioceno se reconoció un “optimum climaticum” con temperaturas superiores a las actuales que produjo un derretimiento parcial de los glaciares Antárticos, con su consecuente influencia sobre el nivel del mar (Zachos et al., 2001). Durante ese período se produjo una transgresión marina que afectó amplias regiones de Sudamérica, incluyendo gran parte de la región pampeana (Haller, 1978; Scasso & del Río, 1987; Aceñolaza, 2000; del Río, 2000; Hernández et al., 2005). La transgresión “Mar Paranaense” presentó dos pulsos: el primero se ellos ocurrió entre 15-13 Ma y el segundo pulso entre los 10-5? Ma (Hernández et al., 2005). Registros del oeste de la provincia de Buenos Aires (Río Colorado y Buenos Aires) muestran que gran parte de la provincia permaneció bajo el mar durante el período completo entre los 15 y 5 Ma (Hernández et al., 2005).

Bajo el concepto de avances y retrocesos propuesto por Ringuelet (1961), es de esperar que en un “optimum climaticum” se vea favorecido un avance de la biota de estirpe guayano-brasileña sobre la provincia de Buenos Aires. En este contexto, la distribución disyunta de *P.*

fernandezae y *P. henselii* puede ser explicada como un proceso vicariante causado por una barrera biogeográfica generada por la transgresión marina.

Para el Pleistoceno existen registros fósiles en la provincia de Buenos Aires que documentan la presencia de mamíferos relacionados con grupos de Brasil (Vucetich & Verzi, 2002; Vucetich et al., 2005) y anuros de climas cálidos (Báez et al., 2008). Pero también se registra fauna típica de la Patagonia (Acosta-Hospitaleche & Tambussi, 2000; Pardiñas, 2004; Picasso et al., 2011), revelando la influencia que tuvieron las reiteradas glaciaciones ocurridas en Patagonia (Rabassa et al., 2005). La composición actual de los anuros de Buenos Aires está representada por 29 especies (Vaira et al., 2012); ninguna de ellas puede ser considerada como representante de la fauna patagónica. Los géneros *Scinax*, *Pseudis*, *Elachistocleis*, *Melanophryniscus*, el grupo de especies *Rhinella granulosa*, entre otros, incluyendo el género *Physalaemus* son los representantes más australes de sus respectivos linajes filogenéticos. Esta apreciación podría indicar que los anuros que componen la fauna de la provincia de Buenos Aires son colonizadores recientes. Los resultados aquí obtenidos revelan que *P. fernandezae* habita en la región pampeana desde tiempos previos a los períodos pleistocénicos, pero la ausencia de otros endemismos de anfibios en Buenos Aires podría significar que son invasores recientes. La historia demográfica de *Pseudopaludicola falcipes* sugiere que su llegada a Buenos Aires es mucho más reciente que la de *Physalaemus fernandezae* (Langone, 2013), pero son necesarios más estudios que permitan fundamentar esta generalización.

Otro resultado que soporta la divergencia antigua entre *P. fernandezae* y *P. henselii* es el obtenido al calcular la tasa de mutación en los genes utilizados. En general, los relojes moleculares muestran gran variación dependiendo de diversos factores. La cantidad de nodos calibrados, la ubicación en el árbol de los nodos calibrados (basales o terminales) y obviamente la calidad de las dataciones, pueden afectar los resultados (Sauquet et al., 2012). En las pruebas aquí realizadas también se encontró un amplio rango de resultados. Por lo tanto, para determinar la tasa de mutación de los genes utilizados para el análisis filogeográfico se contó con dos opciones: 1- elegir arbitrariamente la datación de alguno de los árboles obtenidos, o 2- considerar directamente que la transgresión marina del Mioceno generó un proceso vicariante entre ambas especies. Cuando la divergencia entre *P. henselii* y *P. fernandezae* fue calibrada en 14 ± 1 Ma, la tasa de mutación del fragmento de *Cyt-B*, mostró valores acordes con las tasas obtenidas para salamandras (Mueller, 2006), anuros bufónidos (Macey

et al., 1998) y dendrobátidos (Lougheed et al., 1999). Esto es congruente con lo observado por Crawford (2003) para el gen mitocondrial *ND2* en el género *Craugastor*. Los valores de las tasas de mutación obtenidos al calibrar la divergencia en 5 ± 1 Ma (posteriormente a la transgresión marina) son mucho más elevados que las tasas de mutaciones utilizadas habitualmente para anfibios y superan ampliamente las tasas de mutación del ADNmt sugeridas por Moritz et al. (1987). Esto da mayor soporte a que la divergencia entre ambas especies se habría producido como consecuencia de la transgresión del mar Paranaense.

4.3. Diversidad genética y estructura poblacional

Physalaemus henselii y *P. fernandezae* mostraron valores moderados a elevados en la diversidad haplotípica y nucleotídica (Hd y π). Para ambas especies el fragmento de *D-loop* presentó mayor diversidad nucleotídica que el gen *Cyt-b*, mientras que la diversidad haplotípica mostró valores similares entre ambos genes. El número de haplotipos encontrados en *P. henselii* fue similar en ambos marcadores estudiados, en contraste con lo observado en *P. fernandezae* donde el fragmento de *D-loop* presentó mayor cantidad de haplotipos. Se ha registrado que el gen *Cyt-b* es mucho más conservado que el *D-loop* (Avise, 1994; Saccone et al., 2000; Teacher et al., 2011), pero en anuros se han reportado excepciones a esta generalización (e.g. Martinazzo et al., 2011).

La diversidad genética en un contexto espacial mostró en cada especie un patrón congruente, es decir, el patrón obtenido con el gen *Cyt-b* fue semejante al obtenido con el *D-loop* y al obtenido con la matriz de ambos fragmentos concatenados. A nivel poblacional, los valores elevados en ambos estimadores de diversidad genética (Hd y π) sugieren que la o las poblaciones analizadas se encuentran estables demográficamente y con un tamaño poblacional efectivo grande a lo largo del tiempo. Sin embargo estos resultados también podría sugerir contactos secundarios después de un aislamiento poblacional (Grant & Bowen, 1998; Avise, 2000). En las especies estudiadas la mayor diversidad genética fue observada en donde se solapan linajes. A nivel regional, *P. henselii* presenta los mayores índices de diversidad (Hd y π) en la localidades de “Eldorado do Sul” y “São Sepé”. En la primera de estas poblaciones se encontró un haplotipo muy divergente (H32) y en la segunda se superponen los dos de los tres linajes principales obtenidos para la especie, linaje A y C. La diversidad genética dis-

minuye gradualmente hacia las poblaciones ubicadas en dirección oeste (“Pueblo Madera” y “El Palmar”). Las poblaciones ubicadas en el centro-sudeste de Uruguay, “Ruta 7”, “Rocha” y “Sierra del Tigre”, mantienen valores relativamente altos. Para *P. fernandezae* la población más diversa fue “Chascomús”, la cual se corresponde aproximadamente con el centro del área de distribución, desde donde los índices de diversidad disminuyen en dirección norte, sur y oeste. Los análisis espaciales de los linajes que componen a cada especie evidencian que la mayor diversidad genética se presenta justamente en aquellas poblaciones donde se solapan linajes intraespecíficos. Estos patrones se atribuyen a un aislamiento y contacto secundario (Grant & Bowen, 1998; Avise, 2000).

El conocimiento actual de patrones filogeográficos en anuros de las regiones templadas es muy escaso; únicamente se realizaron estudios en anfibios de Chile (Correa et al., 2010; 2012), del noroeste Argentino (Koscinski et al., 2009) y unas pocas anuros de la región patagónica (Martinazzo, 2011; Nuñez et al., 2011). Particularmente en la región pampeana el único trabajo filogeográfico en anuros es una tesis doctoral reciente que aún no ha sido publicada (Langone, 2013). De esta forma es evidente que los resultados aquí obtenidos pueden ser discutidos y contrastados con relativamente poca información. En este sentido, la interpretación de los resultados no permite esclarecer si el patrón encontrado en cada especie se debe a fenómenos que afectaron la biota en general o simplemente a la historia singular de cada una de ellas.

En *P. henselii* el análisis de varianza molecular (AMOVA) y la prueba de Mantel mostraron una marcada estructuración poblacional y un fuerte aislamiento por distancia. En cambio *P. fernandezae* mostró un leve aislamiento por distancia y una estructura poblacional mucho menor que la de *P. henselii*. Debido a que estas especies presentan gran similitud morfológica, utilizan el mismo microhábitat y comparten características reproductivas peculiares, como reproducirse en invierno (Barrio, 1964; Maneyro et al., 2008; Marangoni et al., 2012), la primera explicación que se desprende es que las diferencias en el patrón de estructura poblacional están relacionadas a las diferencias topográficas del terreno. *Physalaemus fernandezae* se distribuye sobre la planicie de la provincia de Buenos Aires (Barrio, 1964; Gallardo, 1965; este trabajo), en donde las únicas barreras posibles son los cauces de los ríos; mientras que *P. henselii* ocupa áreas más onduladas y atravesadas por “cuchillas” que recorren Uruguay y el sur de Brasil (Barrio, 1964; Nuñez et al., 2004; este estudio). Recientemente se demostró que

las especies de anuros que se distribuyen en terrenos con topografías complejas tienen una mayor estructuración genética (Guarnizo & Cannatella, 2013). Las diferencias de estructura filogeográfica observadas en *P. fernandezae* y *P. henselii* podrían ser adjudicadas a las diferencias de la topología del terreno. En contraste, si la topología del terreno fuera un factor determinante en la estructura genética o filogeográfica es de esperar que *Pseudopaludicola falcipes*, que habita sobre la misma geografía que *P. henselii*, tenga cierta congruencia en su patrón, pero esto no ocurre. Según los análisis realizados por Langone (2013), los tres genes analizados para *Pseudopaludicola falcipes* presentan haplotipos ancestrales ampliamente distribuidos, una débil estructura filogeográfica y muy poca señal de aislamiento por distancia, patrón contrario al encontrado en *P. henselii*. Debe tenerse en cuenta que las “cuchillas” de Uruguay y sur de Brasil no presentan gran altura y que seguramente las especies difieran en su ecología. *Physalaemus henselii* y *Pseudopaludicola falcipes* comparten características como: tamaños corporales similares, sus puestas poseen aproximadamente la misma cantidad de huevos y ambas especies utilizan ambientes temporarios para su reproducción, pero una de las diferencias más relevantes es su temporada de actividad reproductiva, primavera-verano para *P. falcipes* e invierno para *P. henselii* (Barrio, 1945; 1964; Cei, 1980; Maneyro et al., 2008; Santos et al., 2008). Con los análisis aquí realizados, no puede adjudicarse las diferencias de estructura filogeográfica entre *P. henselii* y *P. falcipes* a sus temporadas de reproducción, porque es probable que las especies difieran en muchos más aspectos (e.g. uso de microhabitat, vagilidad). Sí fue observado que el aislamiento por distancia entre las poblaciones de *P. henselii* tomó mejor ajuste cuando se consideró la topología de terreno, lo cual sugiere que la geografía tiene efecto sobre la estructura poblacional de esta especie. La comparación con *P. falcipes* deja en evidencia que ante una misma geografía, especies con algunas características similares, pueden desarrollar diferentes patrones filogeográficos. Sin embargo, *P. fernandezae* no muestra indicios que la existencia de los ríos que recorren la provincia de Buenos Aires funcionen como barreras geográficas. Resultados similares han sido reportados para ríos de mucho mayor caudal para especies de este género (Funk et al., 2007). En consecuencia, las diferencias del patrón filogeográfico entre *P. henselii* y *P. fernandezae* son congruentes con las observaciones de Guarnizo & Cannatella (2013), a mayor complejidad topográfica mayor estructura genética. Pero la comparación entre *P. henselii* y *P. falcipes* demuestra esta asociación no siempre se cumple.

En ambas especies estudiadas la red de haplotipos sugiere una estabilidad demográfica (Templeton et al., 1995; Avise, 2000). Cada una de ellas presenta linajes que pueden ser reconocidos en las redes y en los árboles filogenéticos de haplotipos. Como muestran los resultados, *P. henselii* presenta tres linajes principales (A, B y C) que a su vez tienen sublinajes diferenciados, mientras que *P. fernandezae* presenta dos linajes donde sólo uno de ellos mostró sublinajes (el linaje B). Independientemente de la genealogía recuperada, las diferencias entre las redes de cada especie están dadas en el patrón filogenético y espacial. En *P. henselii* existe una discontinuidad filogenética con separación espacial entre los linajes A y B, acercándose a la categoría I propuesta por Avise (1987; 2000). Mientras que la relación entre los linajes A y C podría ser clasificada como categoría II, donde hay una discontinuidad filogenética sin una completa separación espacial. El haplotipo H36, perteneciente al linaje C, es el único ejemplar muestreado al norte del Río Jacuí (población de “Gravataí”) y el haplotipo H6, también del mismo linaje, fue hallado en una población del sur de Río Jacuí pero muy cercana al cauce del río (“Eldorado do Sul”). Esta última población presenta un predominio del linaje A, pero es el área donde se solapan los linajes A y C. El resultado puede ser interpretado al menos de dos maneras: 1- se trata de zonas donde se producen contactos secundarios después de un largo período de aislamiento, o 2- son regiones donde se encuentran haplotipos relictuales. En base a los resultados obtenidos no se puede descartar ninguna de estas dos hipótesis, pero la primera interpretación (contacto secundario) es muy probable. Los haplotipos H6 y H36 son poco frecuentes (un ejemplar para cada uno), el árbol filogenético recupera al linaje C como hermano del B pero sin una buena medida de soporte, y la red de haplotipos genera varios haplotipos hipotéticos para poder conectar al linaje C con el resto de la red. A su vez, el muestreo al norte del Río Jacuí es de sólo un ejemplar en la población de “Gravataí”. Quizá con mayor muestreo en ese área se pueda dilucidar si: 1- el linaje C es parte de un linaje relictual o, 2- está bien representado al norte del Río Jacuí y existe un contacto secundario con el linaje A después de un período de aislamiento.

Por otra parte, el haplotipo H32 es el más basal del linaje A y también es muy divergente. Este fue hallado en un ejemplar al sur del Río Jacuí, población de “São Sepé”, y presenta 28 pasos mutacionales respecto del linaje A, distancia mayor a la encontrada entre los linajes A, B y C. Al igual que el linaje C, este haplotipo podría estar representando la existencia de otro linaje adicional a los encontrados en este trabajo.

En *P. fernandezae* se encontró un patrón muy diferente; no se presentan discontinuidades filogenéticas importantes y la separación espacial entre los linajes no es completa. El linaje A se encuentra muy poco representado al sur del Río Salado y el sublinaje B2 está muy poco representado al norte del Río Salado y en las poblaciones del centro-sur. Como se puede apreciar en la red de haplotipos, la mayoría de los haplotipos están presentes en una sola población. De los 58 haplotipos obtenidos para la especie sólo 6 están compartidos por más de una población, lo cual muestra que no existe un alto flujo génico entre las poblaciones. De la clasificación propuesta por Avise et al. (1987) y Avise (2000) el patrón encontrado para *P. fernandezae* puede ser clasificado en la categoría III, donde el flujo génico dentro de la especie es limitado y sus poblaciones no se subdividen por barreras geográficas, pero los linajes no tienen la suficiente separación geográfica como para que el patrón coincida completamente con ésta categoría. La poca discontinuidad filogenética posiblemente se deba a la juventud del sistema, aproximadamente 0,5 ma (ver abajo).

4.4. Historia demográfica

En las 4 pruebas realizadas en el análisis filogenético se pudo observar que *P. henselii* coalesce aproximadamente entre los 0,9 y 1,2 Ma y que *P. fernandezae* coalesce en los aproximadamente 0,5 Ma. La gran discordancia entre el tiempo de divergencia entre las especies y el tiempo de coalescencia propio de cada una de ellas puede ser explicado por: 1- los genes utilizados no recuperan la historia completa o 2- existieron procesos demográficos que borraron parte de la historia genealógica (cuellos de botella). En el mismo árbol filogenético y con los mismos genes, los ejemplares de *Engystomops pustulosus* muestran un tiempo de coalescencia de aproximadamente 6 Ma. Este resultado sugiere que los genes utilizados pueden recuperar información mucho más antigua, y es por ello que pudieron existir procesos demográficos que afectaron de manera diferencial a cada una de las especies.

La información genética obtenida para cada especie permite remontarnos únicamente hasta el Pleistoceno, período que se caracteriza por grandes oscilaciones climáticas. Los períodos fríos durante el Pleistoceno están muy bien documentados por la presencia de glaciares en Patagonia (Rabassa et al., 2005). Diferentes estudios relatan los profundos efectos sobre la biota en el hemisferio norte y en latitudes altas del hemisferio sur (e.g. Hewitt, 2000; 2004;

Zemlak et al., 2008). En anuros del hemisferio sur se registran los efectos de las oscilaciones climáticas sobre el noroeste de Argentina y sur de Bolivia en poblaciones de *Hypsiboas riojanus* (Koscinski et al., 2009) y en Patagonia sus efectos en *Eupsophus calcaratus* (Nuñez et al., 2011). En otras regiones distantes al emplazamiento de glaciares, como en el noreste de Brasil, también se reconocen efectos de éstas oscilaciones climáticas sobre distintos grupos de anuros (e.g. Carnaval et al., 2009).

La coalescencia completa de *P. henselii* recupera aproximadamente 1 Ma de historia para la especie. Esto coincide con el desarrollo de la Gran Glaciación Patagónica (Rabassa et al., 2005). A pesar de que no existen registros concretos sobre sus efectos sobre la región pampeana, durante los períodos glaciares el clima fue modelado por los vientos fríos y secos provenientes del sur (Rabassa et al., 2011). En este período climático muy desfavorable existe la posibilidad que *P. henselii* haya sufrido una marcada reducción en su tamaño poblacional y puede ser por esta causa que no se pueda recuperar información más allá de este momento. El análisis de filogeografía bayesiana propone que el centro de origen de *P. henselii* se ubica entre el norte de Uruguay y sur de Brasil. El estudio realizado por Langone (2013) muestra que *Pseudopaludicola falcipes* presenta un centro de origen geográficamente muy próximo al de *P. henselii*, pero su análisis recupera ~5 Ma. Al margen de las diferencias temporales, es muy llamativo que las únicas dos especies de anuros estudiadas en la región presenten un centro de origen tan próximo; quizá con mayor cantidad de estudios se pueda detectar si la región comprendida entre el sur de Brasil y norte de Uruguay presentó características particulares o favorables en los momentos de adversidad climática global. Los skyline-plots bayesianos y las pruebas de demografía muestran que posteriormente a la Gran Glaciación Patagónica, ningún linaje sufre reducciones en su tamaño efectivo poblacional. Es posible que los períodos glaciares posteriores hayan tenido un menor efecto relativo en el territorio Uruguayo. En el linaje B se observa que desde su origen se encuentra en un proceso de crecimiento de tamaño poblacional, este es aproximadamente hace 200 mil años. El análisis de filogeografía bayesiana muestra que esta linaje toma, desde su origen, una ruta de dispersión hacia el sur, poblaciones de “Sierra del Tigre”, “Rocha” y “Ruta 7”. Por ende, en el linaje B, el proceso de expansión geográfica fue acompañado por un proceso de crecimiento en el tamaño efectivo poblacional, que continúa hasta la actualidad. El linaje A mostró un período de crecimiento en el tamaño efectivo poblacional hace ~40 mil años, coincidente con su llegada a la región

de Pueblo Madera, pero luego su tamaño efectivo poblacional se estabiliza hasta la actualidad. Los resultados de Langone (2013) muestran que *Pseudopaludicola falcipes* no tuvo fluctuaciones poblacionales durante el Pleistoceno. Estas diferencias de patrón entre especies co-distribuidas quizá se puedan atribuir al gran tamaño poblacional reportado en *P. falcipes* o bien a diferentes requerimientos ecológicos.

En *P. fernandezae* se recuperó una historia genealógica aún más corta, no retrotrayéndose mucho más allá del Pleistoceno medio (~500 mil años). Para ese momento se registran situaciones climáticas muy cambiantes con cortos períodos cálidos y húmedos en condiciones predominantemente frías y áridas (Ortiz Jaureguizar & Cladera, 2006 y bibliografía allí citada). El registro fósil de Buenos Aires reporta una fauna de mamíferos típica de climas cálidos (Verzi et al., 2004; Vucetich & Verzi 2002), pero a su vez en el mismo período se registra la extinción de anuros de climas cálidos (Báez et al., 2008). La reconstrucción coalescente de *P. fernandezae* llega hasta este período y es difícil asociar los datos obtenidos en este trabajo con un evento climático en particular. Las pruebas demográficas indicaron expansión en los sublinajes B2 y B3, mientras que los skyline-plots bayesianos sugieren para los mismos linajes una estabilidad demográfica. Los linajes A y B1 muestran un período de incremento en el tamaño efectivo poblacional que posteriormente se estabiliza. En los skyline-plot bayesianos no se observa un descenso del tamaño efectivo poblacional en ningún linaje, lo cual indicaría que los descensos de la temperatura y la humedad provocados por las reiteradas glaciaciones, en especial por la última gran glaciación (Iriondo, 1999; Rabassa et al., 2005) no parecen haber dejado huellas. La reconstrucción realizada con el análisis de filogeografía bayesiana sugiere que la especie tiene un centro de origen justamente en la depresión del Río Salado y que desde allí se dispersó hasta ocupar la actual distribución geográfica. Es posible que la retracción y dispersión de *P. fernandezae* se haya dado una sola vez, o que haya acompañado de manera cíclica los cambios de las condiciones climáticas de la región pampeana (Tonni & Fidalgo, 1982; Iriondo, 1999; Rabassa et al., 2005; 2011; Ortiz Jaureguizar & Cladera, 2006).

En anfibios se ha demostrado que los ríos pueden actuar como eficientes rutas de dispersión, dando como resultado una baja estructura poblacional (Jungels et al., 2010). Dado que la provincia de Buenos Aires está sujeta a recurrentes inundaciones, esto podría explicar porque la estructura poblacional observada en *P. fernandezae* es menor a la hallada en *P. henselii*. Los cursos fluviales de la provincia muestran un residuo de una red hidrográfica más

4. Discusión

rica que corría en sentido oeste-este (Frenguelli, 1956), pero los resultados aquí obtenidos desestiman la posibilidad de que esta red haya funcionado como ruta de dispersión. La diversidad genética disminuye en sentido contrario (este-oeste), la red de haplotipos y el análisis de filogeografía bayesiana también indican una dispersión en sentido opuesto a los cauces de los principales ríos.

Es de suponer, que si *P.fernandezae* y *P. henselii* son especies hermanas y ambas se reproducen en invierno, su ancestro común también tendría este comportamiento. Por otro lado, ninguna de las dos especies muestra indicios de reducción poblacional asociada a los cambios climáticos del Pleistoceno, particularmente a los períodos glaciares. Entonces, ¿su adaptación a reproducirse en invierno habría sido la clave para sobrevivir a los momentos glaciares? En los períodos glaciares ¿habrán utilizado los veranos glaciares para su reproducción?

Conclusiones

- ♣ De no reportarse nuevos registros para el territorio uruguayo, *Physalaemus fernandezae* puede ser considerada como el único anfibio endémico de la provincia de Buenos Aires con una distribución completamente disyunta respecto de *P. henselii*.
- ♣ Los caracteres moleculares muestran que *P. fernandezae* y *P. henselii* son especies hermanas y que su divergencia data de aproximadamente 15 Ma, momento en que la transgresión marina del “Mar Paranaense” afectó la región pampeana.
- ♣ *Physalaemus henselii* presenta una fuerte estructura poblacional, representada por tres linajes principales que se superponen únicamente en la población de “Eldorado do Sul”, Brasil.
- ♣ *Physalaemus fernandezae* no presenta una marcada estructura filogeográfica, dentro de la especie se distinguen linajes sin grandes quiebres geográficos y filogenéticos.
- ♣ Estas especies tienen gran similitud morfológica, el mismo microhábitat y comparten características reproductivas particulares como reproducirse en invierno. Por lo tanto, es muy probable que las diferencias observadas en el patrón de estructura poblacional estén ligadas a la topografía del terreno donde habitan.
- ♣ La historia demográfica recuperada para cada especie sugiere que ambas fueron afectadas por las oscilaciones climáticas ocurridas durante el Pleistoceno.

Bibliografía

- Aceñolaza, F.G. (2000) La Formación Paraná (Mioceno medio): estratigrafía, distribución regional y unidades equivalentes. El Neógeno de Argentina, F.G. Aceñolaza & R. Herbst (Eds). INSUGEO. Serie de Correlación Geológica, 14: 9–27.
- Acosta-Hospitaleche, C. & Tambussi C. (2000) *Pterocnemia pennata* en el Pleistoceno tardío-Holoceno de Monte Hermoso, provincia de Buenos Aires (Argentina): su importancia paleoambiental. Ameghiniana, Suplemento, 37, 68R.
- Acosta, M.C. & Premoli A.C. (2010) Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 54: 235–242.
- Akaike, H. (1974) A new look at the statistical model identification. IEEE, Transactions on Automatic Control, 19: 716–723.
- Alberdi, M.T., Bonadonna F.P. & Ortiz-Jaureguizar E. (1997) Chronological correlation, paleoecology and paleobiogeography of the late Cenozoic South American 'Rionegran' land-mammal fauna: a review. Revista Española de Paleontología, 12: 249–255.
- Alcalde, L., Natale, G.S. & Cajade R. (2006) The tadpole of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leptodactylidae). Herpetological Journal, 16: 203–211.
- Aljanabi, S.M. & Martinez I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic

DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25:, 4692–4693.

Avila, L.J., Morando M. & Sites Jr J.W. (2006) Congeneric phylogeography: hypothesizing species limits and evolutionary processes in Patagonian lizards of the *Liolaemus boulengeri* group (Squamata: Liolaemini). *Biological Journal of the Linnean Society*, 89: 241–275.

Avice, J.C. (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press.

Avice, J.C. (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.

Avice, J.C., J. Arnold, M.R. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Niegel, C.A. Reeb & N.C. Saunders (1987) Intraspecific Phylogeography: The mitochondria DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489–522.

Báez, A.M., Scanferla C.A., Agnolín F.L., Cenizo M. & De Los Reyes M. (2008) Pipid frog from the Pleistocene of the pampas of Southern South America. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 28: 1195–1198.

Bandelt, H.J., Forster P. & Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48.

Barreda, V. & Palazzesi L. (2007) Patagonian vegetation turnovers during the Paleogene-early Neogene: Origin of arid-adapted floras. *The Botanical Review*, 73: 31–50.

Barrio, A. (1945) Contribución al estudio de la etología y reproducción del batracio *Pseudopaludicola falcipes*. *Revista Argentina de Zoogeografía*, 5: 37–43.

Barrio, A. (1953) Sistemática, morfología y reproducción *Physalaemus henselii* (Peters) y *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel) (Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 20: 379–389.

Barrio, A. (1964) Relaciones morfológicas, Eto-Ecológicas y Zoogeográficas entre *Physalaemus henselii* (Peters) y *P. fernandezae* (Müller) (Anura, Leptodactylidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 20: 285–305.

Barrio, A. (1965) El género *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) en la Argentina. *Physis*, 25: 421–448.

Barrio, A. (1967) Notas complementarias sobre el género *Physalaemus* Fitzinger (Anura, Lep-

todactylidae). *Physis*, 74: 5–8.

Beebee, T.J.C. (1996) *Ecology and Conservation of Amphibians*. Chapman & Hall, London.

Beheregaray, L.B. (2008) Twenty years of Phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17: 3754–74.

Bielejec, F., Rambaut A., Suchard M.A. & Lemey P. (2011) SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*, 27: 2910–2912

Birky, C.W. (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics*, 35: 125–148.

Blotto, B.L., Nuñez J.J., Basso N.G., Úbeda C.A., Wheeler W.C. & Faivovich J. (2013) Cladistics Phylogenetic relationships of a Patagonian frog radiation, the *Alsodes* + *Eupsophus* clade (Anura?: Alsodidae), with comments on the supposed paraphyly of *Eupsophus*. *Cladistics*, 18: 113–131.

Borteiro, C. & Kolenc F. (2007) Redescription of the tadpoles of three species of frogs from Uruguay (Amphibia: Anura: Leiuperidae and Leptodactylidae), with notes on natural history. *Zootaxa*, 1638: 1–20.

Boulenger, G.A. (1882) *Catalogue of the Batrachia Salientia s. Ecaudata in the Collection of the British Museum*. Second Edition. London: London Printed by order of the Trustees.

Boulenger, G.A. (1887). Descriptions of new or little-known South-American frogs of the genera *Paludicola* and *Hyla*. *Annals and Magazine of Natural History*, 20: 295–300.

Breitman, M.F., Avila L.J., Sites Jr W. & Morando M. (2012) How lizards survived blizzards: phylogeography of the *Liolaemus lineomaculatus* group (Liolaemidae) reveals multiple breaks and refugia in southern Patagonia and their concordance with other codistributed taxa. *Molecular Ecology*, 21: 6068–6085.

Brown, W.M., George M. & Wilson A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 1967–1971.

Brusquetti, F. & Lavilla E.O. (2006) *Lista comentada de los anfibios de Paraguay*. Cuadernos de

Herpetología, 20: 3–79.

Cabrera, A.L. & Willink A. (1973) Biogeografía de America Latina. Organización de Estados Americanos, Serie Biología, Monografía N° 13, 117 pp.

Cabrera, A. & Yepes J. (1940) Mamíferos sud-americanos (vida, costumbres y descripción). Historia Natural Ediar, Buenos Aires.

Camargo, A., Werneck F.P., Morando M., Sites Jr. W. & Avila L.J. (2013) Quaternary range and demographic expansion of *Liolaemus darwini* (Squamata: Liolaemidae) in the Monte Desert of Central Argentina using Bayesian phylogeography and ecological niche modelling. *Molecular Ecology*, 22: 4038–4054.

Cannatella, D.C. & Duellman W.E. (1984) Leptodactylid frogs of the *Physalaemus pustulosus* Group. *Copeia*, 1984: 902–921.

Cardoso, Y.P. & Montoya-Burgos J.I. (2009) Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region. *Molecular Ecology*, 18: 947–964.

Carnaval, A., Hickerson M., Haddad C.F.B., Rodrigues M.T. & Moritz C. (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, 323: 785–789.

Cei, J.M. (1980) Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano*, (N.S.) Monogr. 2, Firenze, 609 pp.

Correa, C.L., Méndez M.A., Veloso A. & Sallaberry M. (2012) Genetic and Reproductive Evidence of Natural Hybridization between the Sister Species *Rhinella atacamensis* and *Rhinella arunco* (Anura, Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 46: 568–577.

Correa, C., Pastenes L., Sallaberry M., Veloso A. & Méndez M.A. (2010). Phylogeography of *Rhinella spinulosa* (Anura : Bufonidae) in northern Chile. *Amphibia-Reptilia*, 31: 85–96.

Correa, C., Veloso A., Iturra P. & Méndez M.A. (2006) Phylogenetic relationships of Chilean leptodactylids: a molecular approach based on mitochondrial genes 12S and 16S. *Revista Chilena de Historia Natural*, 79: 435–450.

Cosacov, A., Sérsic A.N., Sosa V., Johnson L.A. & Cocucci A.A. (2010) Molecular evidence

-
- of ice-age refugia in the Patagonia steppe and post-glacial colonisation of the Andes slopes: insights from the endemic species *Calceolaria polyrhiza* (Calceolariaceae). *Journal of Biogeography*, 37: 1463–1477.
- Crawford, A.J. (2003) Relative rates of nucleotide substitution in frogs. *Journal of Molecular Evolution*, 57: 636–641.
- Crisci, J., Freire-E S., Sancho G. & Katinas L. (2001) Historical biogeography of the Asteraceae from Tandilia and Ventania. *Caldasia*, 23: 21–41.
- Crisci, J.V., Katinas L. & Posadas P. (2000) Introducción a la teoría y práctica de la biogeografía histórica. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires, Argentina.
- Croizat, L. (1964) Space, time, form: the biological synthesis, Caracas, publicado por el autor.
- Darst, C.R. & Cannatella D.C. (2004) Novel relationships among hyloid frogs inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 462–475.
- Darwin, C.R. (1859) On origin of species, Londres, J. Murray.
- del Río, C.J. (2000) Malacofauna de las Formaciones Paraná y Puerto Madryn (Mioceno marino, Argentina): su origen, composición y significado bioestratigráfico. *El Neógeno de Argentina*, F.G. Aceñolaza & R. Herbst (Eds). INSUGEO. Serie de Correlación Geológica, 14: 77–101.
- Deschamps, J.R., Otero O. & Tonni E.P. (2003) Cambio climático en la pampa bonaerense: las precipitaciones desde los siglos XVIII al XX. Documento de Trabajo N° 109, Universidad de Belgrano. Disponible en http://www.ub.edu.ar/investigaciones/dt_nuevos/109_deschamps.pdf
- Duellman, W.E. (1999) Patterns of distribution of Amphibians. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, USA. pp. 565.
- Duellman, W.E. & Trueb L. (1986) Biology of amphibians. The Johns Hopkins University Press. Baltimore & London, EUA. 620 Pp
- Drummond, A.J., Ho S.Y.W., Phillips M.J. & Rambaut A. (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4, e88.
- Drummond, A.J., Rambaut A., Shapiro B. & Pybus O.G. (2005) Bayesian coalescent inference

-
- of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1185–1192.
- Drummond, A.J., Suchard M.A., Xie D. & Rambaut A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969–1973.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792–1797.
- Excoffier, L. & Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567.
- Excoffier, L., Smouse P.E. & Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.
- Faivovich, J., Ferraro D.P., Basso N.G., Haddad C.F.B., Rodrigues M.T., Wheeler W. C. & Lavilla E.O. (2012) A phylogenetic analysis of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae: Leiuperinae) based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with comments on the evolution of anuran foam nests. *Cladistics*, 28: 460–482.
- Faivovich, J., Haddad C.F.B., Garcia P.C., Frost D.R., Campbell J.A. & Wheeler W.C. (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference To Hyalinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 294: 1–240.
- Farris, J., Albert V., Källersjö M., Lipscomb D. & Kluge A.G. (1996) Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics*, 12: 99–124.
- Fernández, K. (1927) Sobre la biología y reproducción de batracios argentinos (segunda parte). *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba*, 29: 271–328.
- Fernández, K. & Fernández M. (1921) Sobre la biología y reproducción de algunos batracios Argentinos. I. Cystignathidae. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 91: 97–140.
- Fisher, R.A. (1932) *The genetical theory of natural selection*. Oxford University Press, Londres.

-
- Fouquet, A., Blotto L.B., Maronna M.M., Verdade K.V., Juncá Acuña F., de Sá R. & Rodrigues Trefaut M. (2013) Molecular phylogenetics and evolution unexpected phylogenetic positions of the genera *Rupirana* and *Crossodactylodes* reveal insights into the biogeography and reproductive evolution of leptodactylid frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67: 445–457.
- Fouquet, A., Noonan B.P., Rodrigues Trefaut M., Pech N., Gilles A. & Gemmell N.J. (2012) Multiple quaternary refugia in the eastern Guiana shield revealed by comparative phylogeography of 12 frog species. *Systematic Biology*, 61: 461–489.
- Fouquet, A., Pineau K., Rodrigues Trefaut M., Mailles J., Schneider J., Ernst R. & Dewynter M. (2013b) Endemic or exotic: the phylogenetic position of the Martinique Volcano Frog *Allobates chalcopis* (Anura: Dendrobatidae) sheds light on its origin and challenges current conservation strategies. *Systematics and Biodiversity*, 11: 87–101.
- Frenguelli, J. (1956) Rasgos generales de la hidrografía de la provincia de Buenos Aires. Laboratorio de Ensayo de Materiales e Investigaciones Tecnológicas, Serie II: 1–19.
- Frost, D.R. (2013) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6 (9 January 2013). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost, D., Grant, T., Faivovich, J., Bain, R., Haas, A., Haddad C.F.B., de Sá R.O., Channing A., Wilkinson M., Donnellan S.C., Raxworthy C.J., Campbell, J.A. Blotto, B.L., Moler, P., Drewes, R.C., Nussbaum, R.A., Lynch, J.D., Green, D.M. & Wheeler W.C. (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297: 1–370.
- Fu, Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Funk, W.C., Caldwell, J.P., Peden, C.E., Padial, J.M., De la Riva I. & Cannatella D.C. (2007) Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 44: 825–837.
- Furlong, R.F. & Brookfield J.F.Y. (2001) Inference of past population expansion from the timing of coalescence events in a gene genealogy. *Journal of Theoretical Biology*, 209: 75–86.

-
- Gallardo, J.M. (1965) Las especies bonaerenses, de pequeño tamaño, del género *Physalaemus* Fitzinger (Amphibia, Leptodactylidae). *Neotropica*, 11: 27–37.
- Gallardo, J.M. (1974) Anfibios de los alrededores de Buenos Aires. EUDEBA/LECTORES.
- Gallardo, J.M. (1982) Anfibios y Reptiles del Parque Nacional El Palmar de Colon, prov. de Entre Ríos. *Anales de Parques Nacionales*, 15: 65–75.
- Gamble, L.R., McGarigal K. & Compton B.W. (2007) Fidelity and dispersal in the pond-breeding amphibian, *Ambystoma opacum*: Implications for spatio-temporal population dynamics and conservation. *Biological Conservation*, 139: 247–257.
- Glaw, F. & Franzen M. (2006) Type catalogue of amphibians in the Zoologische Staatssammlung München. *Spixiana*, 29: 153–192.
- Goebel, A.M., Donnelly J.M. & Atz M.E. (1999) PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11: 163–199.
- Goloboff, P.A., Farris J.S. & Nixon, K.C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24: 774–786.
- Graham, A. (1992) Utilization of the isthmian land bridge during the Cenozoic: paleobotanical evidence for timing, and the selective influence of altitudes and climate. *Review of Paleobotany and Palynology*, 72: 119–128.
- Grant, W.A.S. & Bowen B.W. (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89: 415–426.
- Grant, T., Frost D.R., Caldwell J., Gagliardo R., Haddad C.F.B., Kok P.R., Means D., Noonan B., Schargel W. & Wheeler W.C. (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 299: 1–262.
- Graybeal, A. (1997) Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macro-

evolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 119: 297–338.

Guarnizo, C.E. & Cannatella D.C. (2013) Genetic divergence within frog species is greater in topographically more complex regions. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 51: 333–340.

Haffer, J. (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131–137.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.

Haller, M.J. (1978) Estratigrafía de la región al poniente de Puerto Madryn, Provincia de Chubut, República Argentina. VII Congreso Geológico Argentino, Buenos Aires, Actas I, 285–297.

Haq, B.U., Hardenbol J. & Vail P. R. (1987) Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science*, 235: 1156–1167.

Harpending, H.C. (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591–600.

Harpending, H.C., Sherry S.T., Rogers A. R. & Stoneking M. (1993) The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology*, 34: 483–496.

Hasegawa, M., Kishino H. & Yano T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160–174.

Hedges, S.B., Duellman W.E. & Heinicke M.P. (2008) New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, 1737: 1–182.

Hensel, R. (1867) Beiträge zur Kenntniss der Wirbelthiere Südbrasieliens. *Archiv für Naturgeschichte*, 120–162.

Hernández, R., Jordan T., Dalenzfarjat A., Echavarria L., Idleman B. & Reynolds J. (2005) Age, distribution, tectonics, and eustatic controls of the Paranense and Caribbean Marine transgressions in Southern Bolivia and Argentina. *Journal of South American Earth Sciences*, 19: 495–512.

-
- Hewitt, G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary Ice Ages. *Nature*, 405: 907–913.
- Hewitt, G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 359: 183–195.
- Heyer, W.R. (1974) Relationships of the marmoratus species group (Amphibia, Leptodactylidae) within the subfamily Leptodactylinae. *Natural History Museum of Los Angeles County - Contributions in Science*, 253: 1–46.
- Heyer, W.R. (1975) A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. *Smithsonian Contributions to Zoology*, n° 199.
- Himes, C.M.T., Gallardo M.H. & Kenagy G.J. (2008) Historical biogeography and post-glacial recolonization of South American temperate rain forest by the relictual marsupial *Dromiciops gliroides*. *Journal of Biogeography*, 35: 1415–1424.
- Ho, S.Y.W. & Shapiro B. (2011) Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, 11: 423–434.
- Hood, G.M. (2009) PopTools version 3.1.1. Available on URL <http://www.cse.csiro.au/poptools>
- Hoorn, C., Wesselingh F.P., ter Steege H., Bermudez M.A., Mora A., Sevink J., Sanmartin I., Sanchez-Meseguer A., Anderson C.L., Figueiredo J.P., Jaramillo C., Riff D., Negri F.R., Hooghiemstra H., Lundberg J., Stadler T., Särkinen T. & Antonelli A. (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330: 927–931.
- Hudson, R.R. (1990) Gene genealogies and the coalescent process. En: D. Futuyma, J. Antonovics (eds.). *Oxford surveys in evolutionary biology*. Oxford University Press, Oxford. pp 1–44.
- Iriondo, M. (1999) Climatic changes in the South American plains: records of a continent-scale oscillation. *Quaternary International* 57/58: 93–112.
- Irisarri, I., San Mauro D., Abascal F., Ohler A., Vences M. & Zardoya, R. (2012) The origin of modern frogs (Neobatrachia) was accompanied by acceleration in mitochondrial and nuclear

substitution rates. BMC genomics, 13: 626.

Jakob, S.S., Martínez-Meyer E. & Blattner F.R. (2009) Phylogeographic analyses and paleo-distribution modeling indicate Pleistocene in situ survival of *Hordeum species* (Poaceae) in southern Patagonia without genetic or spatial restriction. Molecular Biology and Evolution, 26: 907–923.

Jang, Y., Eun H.H., Hyun-Jung L., Soyeon P., Yong-Jin W. & Choe J.C. (2011) Geographic variation in advertisement calls in a tree frog species: gene flow and selection hypotheses. PloS One 6: e23297.

Jungels, J.M., Griffis-Kyle K.L. & Boeing W.J.(2010) Low genetic differentiation among populations of the great plains toad (*Bufo cognatus*) in Southern New Mexico. Copeia, 2010 :388–396.

Katoh, K. & Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution, 30: 772–780.

Kim I., Phillips C.J., Monjeau J.A., Birney E.C., Noack K., Pumo D.E., Sikes R.S. & Dole J.A. (1998) Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. Molecular Ecology, 7: 667–678.

Kimura, M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. Nature, 217: 624–626.

Kimura, M. (1986) DNA and the Neutral Theory. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 312: 343–354.

Kimura, M. (1981) Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78: 454–458.

Kingman, J.F.C. (1982) The Coalescent. Stochastic Processes and Their Applications, 13: 235–248.

Kleinert, K. & Strecker M.R. (2001) Climate change in response to orographic barrier uplift: paleosol and stable isotope evidence from the late Neogene Santa María basin, northwestern Argentina. Geological Society of America Bulletin, 113: 728–742.

-
- Knowles, L.L. (2008) Why does a method that fails continue to be used? *Evolution* 62: 2713–2717.
- Knowles, L.L. & Maddison, W.P. (2002). Statistical phylogeography. *Molecular ecology*, 11: 2623–2635.
- Kolenc, F., Borteiro C., Tedros M., Núñez D. & Maneyro R. (2006) The tadpole of *Physalaemus henselii* (Peters) (Anura: Leiuperidae). *Zootaxa*, 1360: 41–50.
- Kominz, M.A., Browning J.V., Miller K.G., Sugarman P.J., Mizintseva S. & Scotese C.R. (2008) Late Cretaceous to Miocene sea-level estimates from the New Jersey and Delaware coastal plain coreholes: an error analysis. *Basin Research*, 20: 211–226.
- Koscinski, D., Handford P., Tubaro P.L., Sharp S. & Loughheed S.C. (2009) Pleistocene climatic cycling and diversification of the andean treefrog, *Hypsiboas andinus*. *Molecular Ecology*, 17: 2012–2025.
- Kurabayashi, A., Usuki C., Mikami N., Fujii T., Yonekawa H., Sumida M. & Hasegawa M. (2006) Complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of a Malagasy Poison Frog *Mantella madagascariensis*: Evolutionary Implications on mitochondrial genomes of higher Anuran groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 223–236.
- Kurabayashi, A., Sumida M., Yonekawa H., Glaw F., Vences M. & Hasegawa M. (2008) Phylogeny, recombination, and mechanisms of stepwise mitochondrial genome reorganization in mantellid frogs from Madagascar. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 874–891.
- Langone, J.A. (2013) Filogeografía de *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) (Amphibia, Anura). Tesis doctoral no publicada, Universidad de Ciencias, Montevideo, Uruguay, 136 pp.
- Laufer, G. & Barreneche, J.M. (2008) Re-description of the tadpole of *Pseudopaludicola falcipes* (Anura: Leiuperidae), with comments on larval diversity of the genus. *Zootaxa*, 1760: 50–58.
- Lavilla, E. & Langone J. (2004) *Physalaemus fernandezae*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 November 2013.
- Lemey, P., Rambaut A., Drummond A.J. & Suchard, M.A. (2009) Bayesian phylogeography

finds its roots. PLoS computational biology, 5, e1000520.

Lemey, P., Rambaut A., Welch, J.J. & Suchard, M.A. (2010) Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 1877–1885.

Lessa, E.P., D’Elía G. & Pardiñas U.F.J. (2010) Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fueguian rodents. *Molecular Ecology*, 19: 3031–3037.

Librado, P. & J. Rozas (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

Lobo, F. (1996) Nuevas observaciones osteológicas del género *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 43: 318–326.

Lougheed, S., Gascon C., Jones, D.A., Bogart J.P. & Boag P.T. (1999) Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society of London*, 266: 1829–1835.

Lourenço, L.B., Bacci-Júnior M., Martins V.G., Recco-Pimentel S.M. & Haddad, C.F.B. (2008) Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, 132: 255–66.

Lynch, J.D. (1970) Systematic status of the American Leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix*, and *Physalaemus*. *Copeia*, 3: 488–496.

Lynch, J.D. (1971) Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactylid frogs. *Miscellaneous Publication of the Museum of Natural History, The University of Kansas*, 53: 1–238.

Macey, R.J., Schulte II J.A., Larson A., Fang Z., Wang Y., Tuniyev B.S. & Papenfuss T.J. (1998) Phylogenetic relationships of toads in the *Bufo bufo* species group from the eastern escarpment of the Tibetan Plateau: a case of vicariance and dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9: 80–87.

Maddison, W.P. & Maddison D.R. (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75; <http://mesquiteproject.org>

-
- Maneyro, R. & Langone J.A. (2001) Categorización de los Anfibios del Uruguay. Cuadernos de Herpetología, 15: 107–118.
- Maneyro, R., Núñez D., Borteiro C., Tedros M. & Kolenc F. (2008) Advertisement call and female sexual cycle in Uruguayan populations of *Physalaemus henselii* (Anura, Leiuperidae). Iheringia (Série Zoologia), 98: 210–214.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27: 209–220
- Marangoni, F., Barrasso D.A., Cajade R. & Agostini G. (2012) Body size, age and growth pattern of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) of Argentina. North-Western Journal of Zoology, 8: 63–71.
- Marshall, L.G. & Cifelli R.L. (1990) Analysis of changing diversity patterns in Cenozoic Land Mammal Age faunas South America. Palaeovertebrata, 19: 169–210.
- Martinazzo, L.B. (2011) Sistemática, filogenia y filogeografía de las ranas patagónicas *Atelognathus patagonicus* y *Atelognathus praebasalticus*. Tesis doctoral no publicada, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina, 124 pp.
- Martinazzo, L.B., Basso N.G. & Úbeda C.A. (2011) The aquatic and littoral forms of the Patagonian frog *Atelognathus patagonicus* (Batrachylinae): new molecular evidence. Zootaxa, 3129: 62–68.
- McRae, B.H. (2006) Isolation by resistance. Evolution, 60: 1551–1561.
- Miranda-Ribeiro, A. (1926) Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura) Brasileiros. Archivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro, 1–227.
- Morando, M., Avila J.L. & Sites Jr J.W. (2003) Sampling strategies for delimiting species: genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongatus-kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean-Patagonian South America. Systematic Biology, 52: 159–185.
- Morando, M., Avila L.J., Baker J. & Sites Jr J.W. (2004) Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. Evolution, 58: 842–861.

-
- Morando, M., Avila L.J., Turner C. & Sites Jr J.W. (2007) Molecular evidence for species complex in the Patagonian lizard *Liolaemus bibronii* and phylogeography of the closely related *Liolaemus gracilis* (Squamata: Liolaemini). *Molecular phylogenetics and evolution* 43: 952–973.
- Moritz, C. (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, 51: 238–254.
- Moritz, C., Dowling T. & Brown W. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 92: 269–292.
- Moritz, C., Patton J.L., Schneider C.J. & Smith T.B. (2000) Diversification of rainforest faunas?: An integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31: 553–563.
- Moritz, C., Schneider C.J. & Wake D.B. (1992) Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Systematic Biology*, 41: 273–291.
- Morrone, J.J. (2000) El tiempo de Darwin y el espacio de Croizat: rupturas epistémicas en los estudios evolutivos. *Ciencia*, 5: 39–46.
- Morrone, J.J. (2001) Biogeografía de América Latina y el Caribe. M&T-Manuales & Tesis SEA, vol. 3. Zaragoza, 148 pp.
- Müller, L. (1926) Neus Reptilien und Batrachier der Zoologischen Sammiung des bayrischen Staates. *Zoologischer Anzeiger*, 65: 193–200.
- Mueller, R.L. (2006) Evolutionary rates, divergence dates, and the performance of mitochondrial genes in bayesian phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 55: 289–300.
- Muellner, A.N., Tremetsberger K., Stuessy T. & Baeza C.M. (2005). Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochaeris palustris* (Astraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology* 14: 203–212.
- Nascimento, L.B., Caramaschi U. & Gonçalves Cruz C.A. (2005) Taxonomic review of the species groups of the genus *Physalaemus* Fitzinger, 1826 with revalidation of genera *Engystomops* Jiménez de la Espada, 1872 and *Eupemphix* Steindachner, 1863 (Amphibia, Anura,

-
- Leptodactylidae). Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro, 63: 297–320.
- Noonan, B.P. & Wray K.P. (2006) Neotropical diversification: The effects of a complex history on diversity within the poison frog genus *Dendrobates*. Journal of Biogeography, 33: 1007–1020.
- Núñez, D., Maneyro, R., Langone, J.A. & de Sá R.O. (2004) Distribución geográfica de la fauna de anfibios del Uruguay. Smithsonian Herpetological Information Service, 134: 1–34.
- Núñez, J.J., Wood, N.K., Rabanal, F.E., Fontanella, F.M. & Sites J.W. Jr (2011) Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 58: 343–352.
- Ortiz Jaureguizar, E. (1998) Paleoeología y evolución de la fauna de mamíferos de América del sur durante la “Edad de las Planicies Australes” (Mioceno Superior-Plioceno Superior). Estudios Geológicos, 54: 161–169.
- Ortiz Jaureguizar, E. & Cladera G. (2006) Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. Journal of Arid Environments, 66: 498–532.
- Panchal, M. & Beaumont, M.A. (2007) The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. Evolution, 61: 1466–1480.
- Pardiñas, U.F.J. (2004) Roedores sigmodontinos (Mammalia: Rodentia: Cricetidae) y otros micromamíferos como indicadores de ambientes hacia el Ensenadense cuspidal en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina). Ameghiniana, 41: 437–450.
- Parker, W.H. (1927) A revision of the frogs of the genera *Pseudopaludicola*, *Physalaemus*, and *Pleurodema*. Annals and Magazine of Natural History, 9: 450–478.
- Pascual, R. & Ortiz Jaureguizar E. (1990) Evolving climates and mammal faunas in Cenozoic South America. Journal of Human Evolution, 19: 23–60.
- Pascual, R., Ortiz Jaureguizar E. & Prado J.L. (1996) Land mammals: paradigm of Cenozoic South American geobiotic evolution. En: Arratia G. (Ed), Contribution of Southern South America to Vertebrate Paleontology, Müncher Goewissenschaftliche Abhandlungen,

30: 217–226.

- Pastorino, M.J. & Gallo L.A. (2002) Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis*, a cypress native to the Andean-Patagonian forest. *Journal of Biogeography*, 29: 1167–1178.
- Pauly, G.B., Hills D.M & Cannatella D.C. (2004) The history of a nearctic colonization: molecular phylogenetics and biogeography of the Nearctic toads (*Bufo*). *Evolution*, 58: 2517–2535.
- Peters, W. (1872) Über die von Spix in Brasilien gesammelten Batrachier des Königl. Naturalkabinet zu München. *Monatsberichte der Königlichen Preussische Akademie des Wissenschaften zu Berlin*: 196–227.
- Picasso, M.B.J., Degrange F.J., Mosto, M.C. & Tambussi C.P. (2011) Un individuo juvenil de *Pterocnemia pennata* (Aves, Rheidae) en el Pleistoceno de la Región Pampeana: implicancias ontogenéticas y ambientales. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 28: 192–200.
- Poljak, S., Confalonieri V., Fasanella M., Gabrielli M. & Lizarralde M.S. (2010) Phylogeography of the armadillo *Chaetophractus villosus* (Dasypodidae Xenarthra): post-glacial range expansion from Pampas to Patagonia (Argentina). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 38–46.
- Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256.
- Posada, D. & Crandall K.A. (2001a) Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology*, 50: 580–601.
- Posada, D. & Crandall K.A. (2001b) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 37–45.
- Premoli, A.C., Kitzberger T. & Veblen T.T. (2000) Isozyme variation and recent biogeographical history of the longlived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27: 251–260.
- Pyron, R.A. & Wiens, J.J. (2011) A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2,800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 543–583.
- QGIS, Development Team (2013) QGIS v 2.0 Geographic Information System. Open Source

Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>

- Rabassa, J., Coronato A. & Martínez O. (2011) Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103: 316–335.
- Rabassa, J., Coronato A.M. & Salemme M. (2005) Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences*, 20: 81–103.
- Räsänen, M.E., Linna A.M., Santos J.C.R., and Negri F.R. (1995) Late Miocene Tidal deposits in the Amazonian foreland Basin. *Science*, 269: 3–7.
- Rambaut A. & Drummond A.J. (2009) Tracer v1.5.0, MCMC Trace Analysis Tool. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos-Onsins, S.E. & Rozas J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092–2100.
- Rapela, C.W., Pankhurst R.J., Casquet C., Fanning C.M., Baldo E.G., González-Casado M., Galindo C. & Dahlquist J. (2007) The Río de la Plata craton and the assembly of SW Gondwana. *Earth Science Reviews*, 83: 49–82.
- Ringuelet, R.A. (1961). Rasgos Fundamentales de la Zoogeografía Argentina. *Physis*, 22: 151–170.
- Roderick, G.K. (1996) Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41: 325–352.
- Rogers, A.R. & Harpending H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Ron, S.R., Santos J.C. & Cannatella D.C. (2006) Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 392–403.
- Rosenberg, N.A. & M. Nordborg. (2002) Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews*, 3: 380–390.

-
- Saalmann, K., Remus M.V.D. & Hartmann L.A. (2006) Tectonic evolution of the Neoproterozoic São Gabriel Block, southern Brazil: constraints on Brasiliano orogenic evolution of the Rio de la Plata cratonic margin. *Journal of South American Earth Sciences*, 21: 204–227.
- Saccone, C., Gissi C., Lanave C., Larizza A., Pesole G. & Reyes, A. (2000) Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene*, 261: 153–159.
- Sambrook, E., Fritsch F. & Maniatis Y.T. (1989) *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor, Laboratory Press.
- Sano, N., Kurabayashi A., Fujii T., Yonekawa H. & Sumida M. (2005) Complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the Schlegel's tree frog *Rhacophorus schlegelii* (family Rhacophoridae): duplicated control regions and gene rearrangements. *Genes and Genetic Systems*, 80: 213–214.
- Santos, T.G., Kopp K., Spies M.R., Trevisan R. & Cenchin S.Z. (2008) Distribuição temporal e espacial de anuros em área de Pampa, Santa María, RS. *Iheringia (Série Zoologia)*, 98: 244–253.
- Sauquet, H., Ho S.Y.W., Gandolfo M.A., Jordan G.J., Wilf P., Cantrill D.J. Bayly, Michael J., Bromham L., Brown G.K., Carpenter R.J., Lee, D.M., Murphy D.J., Sniderman J.M.K. & Udovicic F. (2012). Testing the impact of calibration on molecular divergence times using a fossil-rich group: the case of *Nothofagus* (Fagales). *Systematic Biology*, 61: 289–313.
- Scasso, R. & del Río C.J. (1987) Ambientes de Sedimentación y Proveniencia de la Secuencia marina del Terciario superior de la península Valdes. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 42: 291–321.
- Schaal, B.A. & Olsen K.M. (2000) Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 7024–7029.
- Sérsic, A.N., Cosacov A., Cocucci A.A., Johnson L.A., Pozner R., Avila L.J., Sites Jr J.W. & M. Morando (2011) Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103: 475–494.
- Shackleton, N.J., Backman J., Zimmerman H., Kent D.V., Hall M.A., Roberts D.G., Schnitker D., Baldauf J., Despraines A., Homrighausen R., Huddleston P., Keene J., Kaltenback A.J.,

-
- Krumsiek K.A., Morton A.C., Murray J.W. & Westberg-Smith J. (1984) Oxygen isotope calibration of the onset of ice-rafting and history of glaciation in the North Atlantic region. *Nature*, 307: 620–623.
- Slatkin, M. & Hudson R.R. (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA Sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129: 555–562.
- Soltis, D.E., Morris A.B., McLachlan J.S., Manos P.S. & Soltis P.S. (2006) Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology*, 15: 4261–4293.
- Stuart, S.N., Hoffmann M., Chanson J.S., Cox N.A., Berridge R.J., Ramani P. & Young B.E. (2008) *Threatened Amphibians of the World*. Primera ed. Barcelona, Spain: LYNX EDITIONS.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by AND polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Tamura, K. & Nei M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512–526.
- Tavaré, S. (1986) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17: 57–86.
- Teacher, A.G.F., Thomas J.A. & Barnes I. (2011) Modern and ancient red fox (*Vulpes vulpes*) in Europe show an unusual lack of geographical and temporal structuring, and differing responses within the carnivores to historical climatic change. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 214.
- Templeton, A.R. (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381–397.
- Templeton, A.R. (2008) Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology*, 17: 1877–1880.
- Templeton, A.R., Routman E. & Phillips C.A. (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA

-
- haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140; 767–782.
- Thompson, J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. (1997) The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876–4882.
- Tomatis, C., Baldo D., Kolenc F. & Borteiro C. (2009) Chromosomal Variation in the Species of the *Physalaemus henselii* Group (Anura: Leiuperidae). *Journal of Herpetology*, 43: 555–560.
- Tonni, E.P. & Fidalgo F. (1982) Geología y paleontología de los sedimentos del Pleistoceno en el área de Punta Hermengo (Miramar, prov. de Buenos Aires, Rep. Argentina): aspectos paleoclimáticos. *Ameghiniana*, 19: 79–108.
- Tsai, Y.H.E. (2011) PhyloGeoViz: a web-based program that visualizes genetic data on maps. *Molecular Ecology Resources*, 11: 557–561.
- Tschudi, J.J. (1838) Clasificación der Batrachier, mit berücksichtigung der fossilen Thiere dieser Abtheilung der Reptilien (pp. 1–124). *Mémoires de la Société des sciences naturelles de Neuchâtel*.
- Vaira, M., Akmentins M., Attademo M., Baldo D., Barrasso D., Barrionuevo S., Basso N., Blotto B., Cairo S., Cajade R., Céspedes J., Corbalán V., Chilote P., Duré M., Falcione C., Ferraro D., Gutierrez R., Marangoni F., Ingaramo R., Junges C., Lajmanovich R., Lescano J., Martinazzo L., Marti R., Moreno L., Natale G.S., Pérez Iglesias J.M., Peltzer P., Quiroga L., Rosset S., Sanabria E., Sanchez L., Schaefer E., Úbeda C. & Zaracho V. (2012) Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 26: 131–159.
- Vera Candioti, M.F., Haad B., Baldo D., Kolenc F., Borteiro C. & Altig R. (2011) Different pathways are involved in the early development of the transient oral apparatus in anuran tadpoles (Anura: Leiuperidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 104: 330–345.
- Verzi, D.H., Deschamps C.M. & Tonni E.P. (2004) Biostratigraphic and palaeoclimatic meaning of the Middle Pleistocene South American rodent *Ctenomys kraglievichi* (Caviomorpha, Octodontidae). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 212: 315–329.
- Vucetich, M.G. & Verzi D. (2002) First record of Dasyproctidae in the Pleistocene of Argentina.

-
- Paleoclimatic implication. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 178: 67–73.
- Vucetich, M.G., Vieytes E.C. & Palmer M. (2005) Unexpected primitive rodents in the Quaternary of Argentina. *Journal of South American Earth Sciences*, 20: 45–56.
- Wakeley, J. (2007) *Coalescent Theory: An Introduction*. New York: Roberts and Company Publishers.
- Wagler, J. (1830) *Natürliches System der Amphibien, mit vorangehender Classification der Säugethiere und Vogel. Ein Beitrag zur vergleichenden Zoologie*. (J. G. Cotta, Ed.). München, Stuttgart and Tübingen.
- Wang, B., Jiang J., Xie F. & Li C. (2012) Postglacial Colonization of the Qinling Mountains: Phylogeography of the Swelled Vent Frog (*Feirana quadranus*). *PLoS One*, 7: e41579.
- Webb, S.D. (1985) Late Cenozoic mammal dispersals between the Americas. In: *The Great American Biotic Interchange*. Stheli F, Webb SD (Eds.), Plenum Press, New York, 357–386.
- Webb, S.D. (1995) Biological implications of the Middle Miocene Amazon Seaway. *Science*, 269: 361–362.
- Weigt, L.A., Crawford A.J., Rand S.A., & Ryan M.J. (2005) Biogeography of the túngara frog, *Physalaemus pustulosus*: a molecular perspective. *Molecular ecology*, 14: 3857–3876.
- Wells, K. (2007) *The ecology and behavior of amphibians*. Chicago and London: The University of Chicago Press, 1148 pp.
- Wright, S. (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16: 97–101.
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323–354.
- Zachos, J., Pagani M., Sloan L., Thomas E. & Billups, K. (2001) Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292: 686–693.
- Zeisset, I. & Beebee T.J.C. (2008) Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity*, 101: 109–119.
- Zemlak, T.S., Habit E.M., Walde S.J., Battini M.A., Adams E. & Ruzzante D.E. (2008) Across the southern Andes on fin: glacial refugia, drainage reversals and a secondary contact zone

revealed by the phylogeographical signal of *Galaxias platei* in Patagonia. *Molecular Ecology*, 17: 5049–5061.

Zhang, P., Liang D., Mao R.L., Hillis D.M., Wake D.B. & Cannatella D.C. (2013) Efficient sequencing of Anuran mtDNAs and a mitogenomic exploration of the phylogeny and evolution of frogs. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 1899–1915.

Índice de tablas

2.1. Comparación de los métodos de extracción de ADN	28
2.2. Cebadores utilizados en amplificación y secuenciación	30
3.1. Estrategias de alineamiento	45
3.2. Tasas de mutación	50
3.3. Poblaciones de muestradas	51
3.4. Diversidad genética de <i>P. henselii</i> en cada fragmento (<i>Cyt-b</i> ; <i>D-loop</i>)	55
3.5. Diversidad genética en <i>Physalaemus henselii</i> con ambos genes concatenados (<i>Cyt-b</i> + <i>D-loop</i>)	56
3.6. Tabla de <i>Fst</i> pareados de <i>P. henselii</i>	62
3.7. AMOVA de <i>Physalaemus henselii</i>	63
3.8. Diversidad genética y pruebas de neutralidad en <i>Physalaemus henselii</i>	66
3.9. Diversidad genética de <i>P. fernandezae</i> en cada fragmento (<i>Cyt-b</i> ; <i>D-loop</i>)	72

3.10. Diversidad genética en <i>Physalaemus fernandezae</i> con ambos genes concatenados (<i>Cyt-b</i> + <i>D-loop</i>)	74
3.11. Tabla de <i>Fst</i> pareados de <i>P. fernandezae</i>	80
3.12. AMOVA de <i>Physalaemus fernandezae</i>	81
3.13. Diversidad genética y test de neutralidad en <i>Physalaemus fernandezae</i>	84

Índice de figuras

1.1. La filogeografía y su relación con otras disciplinas	2
1.2. Marcadores utilizados en filogeografía	3
1.3. Coalescencia	6
1.4. Cambios climáticos durante el Cenozoico	8
1.5. Transgresiones marinas ocurridas en el Mioceno	10
1.6. <i>Physalaemus henselii</i> (Peter, 1872)	15
1.7. Material tipo de <i>Physalaemus henselii</i> (Peter, 1872)	16
1.8. <i>Physalaemus fernandezae</i> (Müller, 1926)	17
1.9. Topotipo de <i>Physalaemus fernandezae</i> (Müller, 1926)	18
1.10. Topotipo de <i>Physalaemus barbouri</i> (Parker, 1927)	19
2.1. Distribución de <i>P. fernandezae</i> y <i>P. henselii</i> (Barrio, 1964)	25
2.2. Extracción de ADN	27

2.3. ADN amplificado	29
3.1. Consenso estricto de las relaciones filogenéticas	46
3.2. Árbol bayesiano de las relaciones filogenéticas	48
3.3. Distribución de <i>P. fernandezae</i> y <i>P. henselii</i>	52
3.4. Árbol de haplotipos de <i>Physalaemus henselii</i>	58
3.5. Distribución espacial de los linajes de <i>Physalaemus henselii</i>	59
3.6. Red de haplotipos de <i>Physalaemus henselii</i>	60
3.7. Prueba de Mantel, <i>Physalaemus henselii</i>	65
3.8. Mismatch de <i>Physalaemus henselii</i> A	67
3.9. Mismatch de <i>Physalaemus henselii</i> B	67
3.10. Skyline-plot bayesiano de <i>Physalaemus henselii</i>	68
3.11. Difusión de <i>Physalaemus henselii</i> a través del tiempo	70
3.12. Árbol de haplotipos de <i>Physalaemus fernandezae</i>	75
3.13. Distribución espacial de los linajes de <i>Physalaemus fernandezae</i>	76
3.14. Red de haplotipos de <i>Physalaemus fernandezae</i>	78
3.15. Prueba de Mantel: <i>Physalaemus fernandezae</i>	83
3.16. Mismatch de <i>Physalaemus fernandezae</i> A	85
3.17. Mismatch de <i>Physalaemus fernandezae</i> B	85
3.18. Skyline-plot bayesiano de <i>Physalaemus fernandezae</i>	86
3.19. Difusión de <i>Physalaemus fernandezae</i> a través del tiempo	87

Apéndices

Apéndice I: Ejemplares utilizados para el análisis filogenético

Lista de especies con números de acceso a GenBank, voucher, longitud del fragmento y fuente de donde se obtuvo.

Especie	N° GenBank	Voucher	pb	Fuente
<i>Adenomera andreae</i>	KC520683.1	317AF	2422	Fouquet et al, 2013b
<i>Adenomera hylaedactyla</i>	DQ283063.1	MJH 3669	2419	Frost et al, 2006
<i>Ceratophrys ornata</i>	AY326013.1	DMH A6	2368	Darst & Cannatella, 2004
<i>Edalorhina perezi</i>	AY843585.1	MJH 7082	2400	Faivovich et al., 2005
<i>Engystomops coloradum</i>	AY834182.1	QCAZ 19418	2432	Ron et al., 2005
<i>Engystomops guayaco</i>	AY834176.1	QCAZ 23652	2422	Ron et al., 2005
<i>Engystomops montubio</i>	AY834177.1	QCAZ 23190	2426	Ron et al., 2005
<i>Engystomops petersi</i>	DQ337234.1	QCAZ 23976	2374	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulatus</i>	DQ337214.1	QCAZ 19606	2378	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 1	DQ337235.1	vial code LLV4	2365	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 2	DQ337236.1	vial code CARU	2372	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 3	DQ337237.1	vial code COL1	2374	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 4	DQ337238.1	vial code SEV1	2374	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 5	DQ337239.1	vial code KM91	2363	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 6	DQ337240.1	vial code Sant1PAN	2372	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 7	DQ337241.1	vial code PA2PAN	2373	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 8	DQ337242.1	vial code NUS1PAN	2373	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 9	DQ337243.1	vial code REY1PAN	2372	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 10	DQ337244.1	vial code LW96	2374	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 11	DQ337246.1	vial code LW1067	2374	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 12	DQ337245.1	vial code LW1083	2374	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 13	DQ337247.1	vial code LW1033	2375	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 14	DQ337248.1	vial code LW1022	2376	Ron et al., 2006
<i>Engystomops pustulosus</i> 15	DQ337249.1	vial code LW101A	2375	Ron et al., 2006
<i>Engystomops randi</i> 1	DQ337228.1	QCAZ 23425	2378	Ron et al., 2006
<i>Engystomops randi</i> 2	AY834179.1	QCAZ 19559	2399	Ron et al., 2005
<i>Eupsophus calcaratus</i>	JX204201.1	MACN 39079	2416	Blotto et al., 2013
<i>Hypsiboas raniceps</i>	AY843657.1	MACN 37795	2426	Faivovich et al., 2005
<i>Hylodes phyllodes</i>	DQ283096.1	CFBH-T 249	2416	Frost et al., 2006
<i>Leptodactylus latrans</i>	AY843688.1	MACN 38648	2420	Faivovich et al., 2005
<i>Leptodactylus fuscus</i>	DQ283404.1	AMNH A139088	2423	Frost et al, 2006
<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	AY326017.1	FC13095; MVZ 233238	2401	Darst & Cannatella, 2004
<i>Lithodytes lineatus</i>	AY326012.1	N. Basso; USP 968438	2449	Darst & Cannatella, 2004
<i>Odontophrynus americanus</i>	AY843704.1	JF1891	2419	Faivovich et al., 2005
<i>Paratelmatobius cardosoi</i>	EU224404.1	CFBH 3267	2380	Lourenço et al., 2008
<i>Paratelmatobius gaigeae</i>	EU224397.1	CFBH 7156	2376	Lourenço et al., 2008
<i>Physalaemus albonotatus</i>	DQ337210.1	DCC-NB 19	2375	Ron et al., 2006
<i>Physalaemus atlanticus</i>	KC692081.1	CFBH-T 5699	2383	Camargo et al., (no publicado)
<i>Physalaemus barrioi</i>	DQ337213.1	TNHC 60105	2374	Ron et al., 2006

continúa en la página siguiente...

Especie	N° GenBank	Voucher	pb	Fuente
<i>Physalaemus biligonigerus</i>	DQ337212.1	DCC-NB 12	2377	Ron et al., 2006
<i>Physalaemus cuqui</i>	—	G1043	2414	no publicado
<i>Physalaemus cuvieri</i>	AY843729.1	MACN 38640	2412	Faivovich et al., 2005
<i>Physalaemus crombiei</i>	KC692082.1	CFBH 24790	2391	Camargo et al., (no publicado)
<i>Physalaemus enesefae</i>	DQ337211.1	MR 005	2376	Ron et al., 2006
<i>Physalaemus spiniger</i>	KC692086.1	CFBH 14899	2386	Camargo et al., (no publicado)
<i>Physalaemus ephippifer</i>	HQ592352.1	ZUEC13704	1461	no publicado
<i>Physalaemus fernandezae</i> 1	—	G1001	2406	no publicado
<i>Physalaemus fernandezae</i> 2	—	G450	2288	no publicado
<i>Physalaemus fernandezae</i> 3	—	G934	2321	no publicado
<i>Physalaemus gracilis</i>	AY680272.1	AJC95-228	2433	Pauly et al., 2004
<i>Physalaemus henselii</i>	KC692084.1	ZVCB 4020	2378	Camargo et al., (no publicado)
<i>Physalaemus henselii</i> 1	—	BKT3435	2361	no publicado
<i>Physalaemus henselii</i> 2	—	G1057	2236	no publicado
<i>Physalaemus henselii</i> 3	—	G1143	2396	no publicado
<i>Physalaemus olfersii</i>	KC692085.1	CFBH 16269	2376	Camargo et al., (no publicado)
<i>Physalaemus nattereri</i>	DQ337208.1	ACJ 95267	2381	Ron et al., 2006
<i>Physalaemus riograndensis</i>	AY326021.1	AJC 95-233	2436	Darst & Cannatella, 2004
<i>Physalaemus santafecinus</i>	—	G486	2309	no publicado
<i>Physalaemus signifer</i>	DQ337209.1	TNHC 60073	2381	Ron et al., 2006
<i>Pleurodema alium</i>	JQ937167.1	CFBH 23348	2414	Faivovich et al., 2012
<i>Pleurodema bibroni</i>	JQ937169.1	BKT 2142	2418	Faivovich et al., 2012
<i>Pleurodema bufoninum</i>	JQ937175.1	CNP A430	2412	Faivovich et al., 2012
<i>Pleurodema cinereum</i>	JQ937178.1	MLP A 4716	2416	Faivovich et al., 2012
<i>Pleurodema kriegi</i>	JQ937188.1	MACN 38738	2417	Faivovich et al., 2012
<i>Pleurodema nebulosum</i>	JQ937196.1	FML 9089	2418	Faivovich et al., 2012
<i>Pleurodema somuncurensis</i>	JQ937203.1	CNP A404	2412	Faivovich et al., 2012
<i>Pleurodema thaul</i>	JQ937205.1	CNP A405	2412	Faivovich et al., 2012
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	AY843741.1	MACN 38647	2413	Faivovich et al., 2005
<i>Pseudopaludicola</i> sp 1	—	LGE 1732	2259	no publicado
<i>Pseudopaludicola</i> sp 2	—	PS99	2275	no publicado
<i>Scythrophrys sawayae</i>	EU224417.1	CFBH 3185	2386	Lourenço et al., 2008
<i>Telmatobius jahuira</i>	DQ283040.1	AMNH A165110	2424	Frost et al., 2006

Nota: Los trabajos referenciados como fuente están citados en la bibliografía general.

Consensos estricto de los árboles obtenidos mediante los alineamientos más parsimoniosos. Los árboles A y B corresponden al alineamiento Q-INS-i con los gaps internos considerados como 5^{to} estado y como entradas faltantes, respectivamente. El C y D corresponden al L-INS-i y al G-INS-i considerando los gaps internos como 5^{to} estado.



Apéndice III: Haplotipos de *Physalaemus henselii*

Lista de haplotipos de *Cyt-b* de *P. henselii*, su distribución y frecuencia en cada localidad.

Haplotipo	Ruta 7	Sierra del Tigre	Rocha	El Palmar	Pueblo Madera	Eldorado do Sul	Gravataí	São Sepé	Total
H1	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H2	—	—	—	—	6	—	—	—	6
H3	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H4	—	—	—	5	1	—	—	—	6
H5	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H6	—	—	—	—	—	—	1	—	1
H7	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H8	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H9	2	1	—	—	—	—	—	—	3
H10	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H11	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H12	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H13	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H14	—	—	3	—	—	—	—	—	3
H15	—	—	2	—	—	—	—	—	2
H16	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H17	1	1	—	—	—	—	—	—	2
H18	3	—	—	—	—	—	—	—	3
H19	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H20	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H21	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H22	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H23	2	—	—	—	—	—	—	—	2
H24	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H25	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H26	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H27	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H28	—	—	—	—	—	2	—	—	2
H29	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H30	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H31	—	—	—	—	—	2	—	—	2
H32	—	—	—	—	—	2	—	—	2
H33	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Total	12	7	8	5	10	10	1	2	55

Lista de haplotipos de *D-loop* de *P. henselii*, su distribución y frecuencia en cada localidad.

Haplotipo	Ruta 7	Sierra del Tigre	Rocha	El Palmar	Pueblo Madera	Eldorado do Sul	Gravataí	São Sepé	Total
H1	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H2	—	—	—	—	8	—	—	—	8
H3	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H4	—	—	—	—	—	—	1	—	1
H5	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H6	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H7	2	1	—	—	—	—	—	—	3
H8	—	2	—	—	—	—	—	—	2
H9	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H10	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H11	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H12	—	—	3	—	—	—	—	—	3
H13	—	—	2	—	—	—	—	—	2
H14	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H15	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H16	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H17	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H18	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H19	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H20	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H21	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H22	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H23	2	—	—	—	—	—	—	—	2
H24	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H25	—	—	—	1	—	—	—	—	1
H26	—	—	—	4	—	—	—	—	4
H27	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H28	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H29	—	—	—	—	—	3	—	—	3
H30	—	—	—	—	—	2	—	—	2
H31	—	—	—	—	—	2	—	—	2
H32	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H33	—	—	—	—	—	2	—	—	2
Total	12	7	8	5	10	10	1	2	55

Haplotipos de *P. henselii* con los marcadores concatenados (*Cyt-b*+*D-loop*), su distribución y frecuencia.

Haplotipo	Ruta 7	Sierra del Tigre	Rocha	El Palmar	Pueblo Madera	Eldorado do Sul	Gravataí	São Sepé	Total
H1	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H2	—	—	—	—	6	—	—	—	6
H3	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H4	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H5	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H6	—	—	—	—	—	—	1	—	1
H7	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H8	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H9	2	1	—	—	—	—	—	—	3
H10	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H11	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H12	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H13	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H14	—	—	3	—	—	—	—	—	3
H15	—	—	2	—	—	—	—	—	2
H16	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H17	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H18	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H19	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H20	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H21	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H22	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H23	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H24	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H25	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H26	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H27	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H28	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H29	—	—	—	1	—	—	—	—	1
H30	—	—	—	4	—	—	—	—	4
H31	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H32	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H33	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H34	—	—	—	—	—	2	—	—	2
H35	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H36	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H37	—	—	—	—	—	2	—	—	2
H38	—	—	—	—	—	2	—	—	2
H39	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Total	12	7	8	5	10	10	1	2	55

Apéndice IV: Haplotipos de *Physalaemus fernandezae*

Lista de haplotipos de *Cyt-b* de *P. fernandezae*, su ditribución y frecuencia en cada localidad.

Haplotipo	Punta Lara	La Balandra	Punta Indio	Chascomús	Dolores	Gral Conesa	Pinamar	Mar de Cobo	Energía	Ayacucho	Daireux	Las Flores	Gral La Madrid	Total
H1	—	—	—	—	—	—	—	—	8	—	8	—	5	21
H2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	4
H5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
H6	5	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6
H7	3	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
H8	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H9	1	5	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	7
H10	—	—	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5
H11	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H12	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H13	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H14	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H15	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H16	—	—	—	—	1	2	5	—	—	—	—	—	—	8
H17	—	—	—	1	2	3	2	4	2	2	1	—	—	17
H18	—	—	—	1	2	2	—	—	—	—	—	—	—	5
H19	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H20	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H21	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H22	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H23	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H24	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H25	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H26	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H27	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H28	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H29	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	2
H30	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	2
H31	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H32	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H33	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Total	11	8	9	9	7	11	8	7	10	5	10	5	7	107

Lista de haplotipos de *D-loop* de *P. fernandezae*, su ditribución y frecuencia en cada localidad.

Haplotipo	Punta Lara	La Balandra	Punta Indio	Chascomús	Dolores	Gral Conesa	Pinamar	Mar de Cobo	Energía	Ayacucho	Daireux	Las Flores	Gral La Madrid	Total
H1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2	4
H2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2
H3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2	4
H5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	4
H6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
H7	4	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6
H8	3	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
H9	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H10	1	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5
H11	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H12	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H13	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H14	—	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
H15	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H16	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H17	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H18	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H19	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H20	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H21	—	—	—	—	2	3	3	—	—	—	—	—	—	8
H22	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—	—	3
H23	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	2
H24	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H25	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H26	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H27	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H28	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	2
H29	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H30	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H31	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	2
H32	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H33	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H34	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H35	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H36	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H37	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H38	—	—	—	—	—	—	—	—	8	—	—	—	—	8
H39	—	—	—	—	—	—	—	1	2	2	—	—	—	5
H40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	2
H41	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1

continua en la página siguiente...

Haplotipo	Punta Lara	La Balandra	Punta Indio	Chascomús	Dolores	Gral Conesa	Pinamar	Mar de Cobo	Energía	Ayacucho	Daireux	Las Flores	Gral La Madrid	Total
H42	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H43	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H44	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H45	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H46	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H47	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H49	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	4
H50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Total	11	8	9	9	7	11	8	7	10	5	10	5	7	107

Lista de haplotipos de *P. fernandezae* con ambos marcadores concatenados (*Cyt-b*+*D-loop*), su distribución y frecuencia.

Haplotipo	Punta Lara	La Balandra	Punta Indio	Chascomús	Dolores	Gral Conesa	Pinamar	Mar de Cobo	Energía	Ayacucho	Daireux	Las Flores	Gral La Madrid	Total
H1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	2	4
H2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2
H3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1
H6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	4
H7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1
H8	4	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5
H9	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3
H10	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H11	1	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5
H12	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H13	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H14	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H15	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H16	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H17	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H18	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H19	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H20	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H21	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H22	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H23	—	—	—	—	—	1	3	—	—	—	—	—	—	4
H24	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	2
H25	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	2
H26	—	—	—	—	2	2	—	—	—	—	—	—	—	4
H27	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H28	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H29	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H30	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H31	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H32	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H33	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H34	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
H35	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1
H36	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—	2
H37	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H38	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H39	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H40	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1

continua en la página siguiente...

Haplotipo	Punta Lara	La Balandra	Punta Indio	Chascomús	Dolores	Gral Conesa	Pinamar	Mar de Cobo	Energía	Ayacucho	Daireux	Las Flores	Gral La Madrid	Total
H41	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H42	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H43	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	1
H44	—	—	—	—	—	—	—	—	8	—	—	—	—	8
H45	—	—	—	—	—	—	—	1	2	2	—	—	—	5
H46	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	1
H47	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	2
H48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
H49	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H50	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H51	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H52	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H53	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H54	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1
H55	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	2
H56	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
H57	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—	—	4
H58	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	1
Total	11	8	9	9	7	11	8	7	10	5	10	5	7	107

Apéndice V: Material revisado

Referencias de los acrónimos:

CENAI: Centro Nacional de Iología, Buenos Aires, Argentina, depositada actualmente en el (MACN) Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Buenos Aires, Argentina. En algunos trabajos se hace referencia a esta misma colección bajo los acrónimos CHINM o INM, pero de cualquier forma que sea nombrada la numeración es la misma (e.g. Barrio, 1964; 1967).

MACN: Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Buenos Aires, Argentina.

MCN: Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Brasil.

MCT: Museu de Ciências e Tecnologia, Setor de Herpetologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

MLP: Museo de Ciencias Naturales de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

MNHM: Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay.

UFRGS: Coleção Herpetológica, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

UNMdP: Colección Herpetológica de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

UNNEC: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

ZVCB: Colección de Vertebrados (Batracios) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, Uruguay.

Material revisado de *Physalaemus fernandezae*

ARGENTINA. PROVINCIA DE BUENOS AIRES. MACN-Entr-3533 (n=1) Vilela; MACN-Entr-1054 Zelaya; MACN-Entr-2507 (n=18) Ranchos; MACN-Entr-2530 (n=14) Libres del Sur, Pdo Chascomús; MACN-Entr-2614 (n=6) Libres del Sur, Pdo Chascomús; MACN-Entr-2628 (n=4) Libres del Sur, Pdo Chascomús; MACN-Entr-2650 (n=5) D’Orbigny, Cnel Suarez; MACN-Entr-3717 (n=3) Libres del Sur, Pdo Chascomús; MACN-Entr-3852 (n=1) Gral Lavalle; MACN-Entr-4003 (n=2) Libres del Sur, Pdo Chascomús; MACN-Entr-6985 Zelaya; MACN-11012/14 "la Brava", Pdo Balcarce; MACN-11157 Libres del Sur; MACN-11245 D’Orbigny, Cnel Suarez; MACN-11320/27 Libres del Sur; MACN-13388/400 Laguna "La Miseria", D’Orbigny; MACN-14327/31 Nuñez; MACN-16468 Monte; MACN-19473 D’Orbigny, Cnel Suarez; MACN-21086/87 "La Luz", D’Orbigny, Cnel Suarez; MACN-21091 "La Providencia", D’Orbigny, Cnel Suarez; MACN-21101/27 "La Armonia", Cobo o Mar Chaquita; MACN-21134/54 25 Km W de Gral Madariaga .el Galpon"; MACN-2167 Ayacucho; MACN-21675/80 Tandil; MACN-21730 Azul, Fortín Irene entre V. Pereda y Ariel; MACN-21843/51 D’Orbigny, Cnel Suarez; MACN-21857/63 "La Luz", D’Orbigny, Cnel Suarez; MACN-23510/15 Benito Juárez; MACN-24771/72 24 km S de San Agustín, Balcarce; MACN-25287/91 Magdalena; MACN-25903/05 20 Km de Gral Alvear; MACN-25935/43 Libres del Sur, Pdo Chascomús; MACN-28267/68 20 Km Sur de Pirovano, Pdo Bolivar; MACN-29509/14 Dolores; MACN-29534 10 Km Sudeste de Cacharí; MACN-29535 14 Km Sur de Ayacucho; MACN-29536 15 Km Este de Ayacucho; MACN-29609/11 Gral Lavalle; MACN-29643/53 "La Esperanza",

Gral Lavalle; MACN-29654/60 "La Esperanza", Gral Lavalle; MACN-29661/63 15 Km Sur de Magdalena; MACN-30117/23 D'Orbigny, Cnel Suarez; MACN-30241/46 10 Km Oeste de Gral Lavalle; MACN-30643 Gral Lavalle; MACN-sn (n=11) "San Pablo", D'Orbigny; MACN-sn (n=7) "La Reconquista", 60 Km SW de Gral Lavalle; CENAI-124 Ing Maschwitz; CENAI-127/28 Pereyra Iraola; CENAI-129 Laguna "La Salada", Gral Madariaga; CENAI-130 400 mt de la estación, Cristiano Muerto; CENAI-131 Pinamar; CENAI-132 Punta Mogotes; CENAI-133 19 Km camino de Mar del Plata a Necochea; CENAI-134 "La Brava"; CENAI-135 5 Km de Cristiano Muerto desde Energía; CENAI-136 5 Km Norte de Punta Médanos; CENAI-137 A 50 Km de Necochea; CENAI-143 4 Km de Mar del Plata hacia Balcarce; CENAI-144 26 Km de Mar del Plata hacia Balcarce; CENAI-145 Orense; CENAI-146 400 mt de la estación, Cristiano Muerto; CENAI-147 "La Brava"; CENAI-148 13 Km de Mar del Plata hacia Balcarce; CENAI-149 21 Km de Necochea hacia Energía; CENAI-150 60 Km de Mar del Plata hacia Necochea; CENAI-151 5 Km de Energía hacia Cristiano Muerto; CENAI-152 /54 de Mar del Plata hacia Cristiano Muerto; CENAI-1348 Madariaga 10 Km hacia Mar del Plata del cruce de ruta que va a Villa Gesell; CENAI-1354 Ojo del agua, proximo a "la Brava"; CENAI-2323/25 Tandil; CENAI-3441/42 Ing Maschwitz; CENAI-9549/52 Arroyo Los Huesos, Azul; CENAI-9555/67 Gonzales Chaves; MLP.A.-1809/10 Punta Indio; MLP.A.-1811/12 Punta Lara; MLP.A.-1827 Punta Indio; MLP.A.-2264 Punta Lara; MLP.A.-2265/66 Pila; MLP.A.-5264/354 Punta Lara; UNNEC-10105/08 Dolores; UNMdP-104 Parque Lago, Pdo de Mar Chiquita; UNMdP-105 A° Sotelo, Pdo de Mar Chiquita; UNMdP-600/01 A° Sotelo, Pdo de Mar Chiquita; UNMdP-602 Parque Lago, Pdo de Mar Chiquita; UNMdP-865 CELPA, Pdo de Mar Chiquita.

URUGUAY. CENAI-122 Barra de Sta Lucía, Sgo Vázquez, Montevideo; CENAI-155 Arroyo Solís, Camino a Pando, Punta del Este; MNHN-1164 Cerro Colorado, Florida; MNHN-1165 Barra de Sta Lucía, Sgo Vázquez, Montevideo.

Material revisado de *Physalaemus henselii*

ARGENTINA. CENAI-126 Isla Martín García, Buenos Aires; CENAI-138 13 Km al norte de Concepción del Uruguay, Entre Ríos; CENAI-140 Gualeguaychú, Entre Ríos; MLP.A.-1095 Salto Grande, Entre Ríos; MLP.A.-3009/10 La Glorieta, PN El Palmar, Entre Ríos.

BRASIL. CENAI-125 Morro de Teresópolis, Porto Alegre, RS; CENAI-142 Laguna del Seminario, Viamão, Porto Alegre, RS; CENAI-156 Lavras do Sul, RS; CENAI-2338/39 Butiá, RS; CENAI-2340 Butiá, RS; CENAI-2341/42 Alegrete, RS; CENAI-2343/44 Alrededores de Ponta Alta, SC; CENAI-2405 Osório, RS; CENAI-2406/07 Porto Alegre, RS; CENAI-2408/09 Bagé, RS; CENAI-2410/15 Viamão, RS; MCN-26 Canela, RS; MCN-58 Teresópolis, Porto Alegre, RS; MCN-287 Itaimbezinho, Cambará do Sul, RS; MCN-297 Praia Florida, Guaíba, RS; MCN-377/78 Emboabas, Osório, RS; MCN-381/84 Emboabas, Osório, RS; MCN-387 Emboabas, Osório, RS; MCN-389 Emboabas, Osório, RS; MCN-530 Teresópolis, Porto Alegre, RS; MCN-532 Teresópolis, Porto Alegre, RS; MCN-736 Agronomia, Porto Alegre, RS; MCN-738 Agronomia, Porto Alegre, RS;

MCN-741/42 Agronomia, Porto Alegre, RS; MCN-744/46 Agronomia, Porto Alegre, RS; MCN-749/50 Agronomia, Porto Alegre, RS; MCN-752/53 Agronomia, Porto Alegre, RS; MCN-755 Agronomia, Porto Alegre, RS; MCN-760 Agronomia, Porto Alegre, RS; MCN-762/65 Agronomia, Porto Alegre, RS; MCN-768 Agronomia, Porto Alegre, RS; MCN-774 Ponta Grossa, Porto Alegre, RS; MCN-776 Ponta Grossa, Porto Alegre, RS; MCN-946 Morro São Pedro, Porto Alegre, RS; MCN-954/62 Morro da Polícia, Porto Alegre, RS; MCN-964 Morro da Polícia, Porto Alegre, RS; MCN-967 Morro da Polícia, Porto Alegre, RS; MCN-968 Morro da Polícia, Porto Alegre, RS; MCN-970/75 Morro da Polícia, Porto Alegre, RS; MCN-977/80 Morro da Polícia, Porto Alegre, RS; MCN-982/86 Morro da Polícia, Porto Alegre, RS; MCN-1030 Viamão, RS; MCN-1089 Viamão, RS; MCN-1235 Estrada Poa-Viamão, parada 44, Viamão, RS; MCN-1302 Tramandaí, RS; MCN-1335 São Francisco de Paula, RS; MCN-1444/46 Campo de transmissores do Ministério da Aeronáutica, Canoas, RS; MCN-1561 Passo do Vigário, Viamão, RS; MCN-1611 Morro Teresópolis, Porto Alegre, RS; MCN-1613 Morro Teresópolis, Porto Alegre, RS; MCN-1821/22 Passo do Vigário, Viamão, RS; MCN-1837/38 Pelotas, RS; MCN-2117 Pelotas, RS; MCN-2131 Cachoeira do Sul, RS; MCN-2151 Morro Teresópolis, Porto Alegre, RS; MCN-2200 Cambará do sul, Itaimbezinho, RS; MCN-2372 Itaimbezinho, Cambará do Sul, RS; MCN-2375/83 Itaimbezinho, Cambará do Sul, RS; MCN-2387 Itaimbezinho, Cambará do Sul, RS; MCN-2509/10 Estância S. Roberto, Quaraí, RS; MCN-2591 Torres, RS; MCN-3208 Torres, RS; MCN-3665/66 Cachoeirinha, RS; MCN-4410 Linha Imperial, Nova Petrópolis, RS; MCN-4617 Linha Imperial, Nova Petrópolis, RS; MCN-4694 Gravataí, RS; MCN-5544 Guaíba Country Club, Guaíba, RS; MCN-5553 Nova Petrópolis, RS; MCN-5667 Fazenda Santa Catarina, Bossoroca, RS; MCN-6036 Gravataí, RS; MCN-7119 Jardim Botânico, Porto Alegre, RS; MCN-7616 Caxias do Sul, RS; MCN-8289/90 Porto Alegre, RS; MCN-8321 Guaíba, RS; MCN-8503/08 Torres, RS; MCN-8761 Estância Guabijú, Santana do Livramento, RS; MCN-8870 Fazenda do Umbu, Cruz Alta, RS; MCN-9227 Bagé, RS; MCN-9260 Pelotas, RS; MCN-9431 Caçapava do Sul, RS; MCN-9519 Cidreira, Tramandaí, RS; MCN-9520 Cidreira, Tramandaí, RS; MCN-9650 Praia de Atlântida, Osório, RS; MCN-9664 Ilha das Flores, Porto Alegre, RS; MCN-9839 Fazenda de Ari Velho, 34km da cidade, Bom Jesus, RS; MCN-9973 Guaíba, RS; MCN-9980/87 Arroio dos Ratos, RS; MCN-10285 Lagoa do Jacaré, Torres, RS; MCN-10358 FINEP, Novo Hamburgo, RS; MCN-10795 Fazenda Guabiju, Santana do Livramento, RS; MCN-10971 Barra do Ribeiro, RS; MCN-11024 Colônia de São Pedro, Torres, RS; MCN-11041 Chaleira Preta, Montenegro, RS; MCN-11053 Triunfo, RS; MCN-11382 Montenegro, RS; MCN-11504 Chaleira Preta, Montenegro, RS; MCN-11538/39 Triunfo, RS; MCN-11632 Itaúba, Arroio do Tigre, RS; MCN-11970 Hotel Ravenac, Laguna, SC; MCN-12098 Lagoa Saloba, Santa Vitória do Palmar, RS; MCN-12383 Guaíba, RS; MCN-12886 Fazenda Capão da Freguesia, São Jerônimo, RS; MCN-12985 Fazenda Capão da Freguesia, São Jerônimo, RS; MCN-13856 Parque Estadual do Tainhas, São Francisco de Paula, RS; MCT-67 Viamão, RS; MCT-149 Porto Alegre, RS; MCT-150/60 Viamão, RS; MCT-161 Porto Alegre, RS; MCT-310 Porto Alegre, RS; MCT-2148 Eldorado do Sul, RS; MCT-2766/67 Eldorado do Sul, RS; MCT-9885 Caçapava do Sul, RS; MCT-11360/61 São Sepé, RS; MCT-11638 Viamão, RS; MCT-11703 Viamão, RS; MCT-11706/10 Viamão, RS; MNHN-836 Osório, RS; UFRGS-694,RS; UFRGS-700 Estação Ecológica do Taim,Rio Grande, RS; UFRGS-962 Estação Ecológica do Taim,Rio Grande, RS; UFRGS-963 Estação Ecológica do Taim,Rio Grande, RS; UFRGS-2675/76 São Sepé, RS; UFRGS-2753 Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, Eldorado do

sul, RS; UFRGS-3163 Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, RS; UFRGS-3165/66 Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, RS; UFRGS-3339/46 Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, RS; UFRGS-3767 Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, RS; UFRGS-4849 Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, RS.

URUGUAY. CENAI-123 Barra de Sta Lucía, Sgo Vázquez, Montevideo; CENAI-166 Colonia del Sacramento, Colonia; CENAI-167 Soriano; CENAI-168 Paysandú; CENAI-169 Treinta y Tres; CENAI-170 Melo, Cerro Largo; CENAI-171 Florida; CENAI-598/618 Barra de Sta Lucía, Montevideo; CENAI-732 Pueblo Sgo Vázquez, Montevideo; CENAI-3069 Arroyo las Tunas, Canelones; MNHN-415 Puntas Arroyo San Carlos, Rocha; MNHN-451 Paso Estévez, A° Quebrada Chico, Tacuarembó; MNHN-452 Santa Ana, Artilleros, Colonia; MNHN-460 Arequita, Lavalleja; MNHN-480 Piriapolis, Maldonado; MNHN-698 Estancia Bella Vista próximo a Zapican, Lavalleja; MNHN-877 Santa Clara, Treinta y Tres; MNHN-1135 Parque Nacional San Miguel, Rocha; MNHN-1136 25 Km WSW de Ciudad de Treinta y Tres, Olimar Chico, Treinta y Tres; MNHN-1137 Carrasco, Montevideo; MNHN-1138 cerro Pan de Azúcar, Maldonado; MNHN-1139 7 Km de desembocadura Río Tacuarembó, Río Negro, Tacuarembó; MNHN-1140 10 Km de Arroyo Grande, Arroyo del Perdón, Soriano; MNHN-1141 11a. Secc. Sobre Arroyo La China, Arroyo Tapes de Godoy, Lavalleja; MNHN-1142 Lagomar, Canelones; MNHN-1143 A° Pereira, Rincón de Arazatí, San José; MNHN-1144 Escuela de Agronomía, Rivera; MNHN-1145 Salinas, Canelones; MNHN-1146 Estación Solís, Maldonado; MNHN-1147 Río Tacuarí, Cerro Largo; MNHN-1227 20 Km SE de Melo, Sierra de Vaz, Río Tacuarí, Cerro Largo; MNHN-1466 A° Valdez, San José; MNHN-1514 Laguna Aeropuerto de Carrasco, Canelones; MNHN-1526/27 20 KM al SE Melo, Sierra de Vaz, Cerro Largo; MNHN-1532 Río Tacuarí, Cerro Largo; MNHN-1606 A° Salsipuedes Grande, Río Negro; MNHN-1668 Sierra de Ánimas, Maldonado; MNHN-1990 Pan de Azúcar, Maldonado; MNHN-2399 cerro Pan de Azúcar, Maldonado; MNHN-2462 Carrasco, Montevideo; MNHN-6811/12 Balneario "La Tuna", Canelones; MNHN-6813 3 Km oeste de Playa Pascual, San José; MNHN-6814 Arroyo de Estado, Durazno; MNHN-6841 Refugio de fauna "Laguna Castillo", Rocha; MNHN-6854 Aeropuerto Carrasco, Canelones; MNHN-6961 2 km al oeste de Playa Pascual, San José; ZVCB-126 Proximidades del Arroyo Milano, Florida; ZVCB-173 Santa Clara de Olimar, Treinta y Tres; ZVCB-309 Bañado Tigre Viejo, Canelones; ZVCB-383 Aguas Blancas, Lavalleja; ZVCB-417 Arroyo del Cordobés "Paso de la Cruz", Durazno; ZVCB-450 Santa Clara de Olimar, Treinta y Tres; ZVCB-460 Cerro Pan de Azúcar, Maldonado; ZVCB-486 Sierra de Mahoma, San José; ZVCB-505 Aguas Blancas, Lavalleja; ZVCB-526 Arroyo La Tuna, Canelones; ZVCB-607 Río Olimar a 24 Km. del Cebollatí 7a sección, Treinta y Tres; ZVCB-625 Rocha, Rocha; ZVCB-633 Balneario Lagomar, Canelones; ZVCB-635 Estación Solís, Maldonado; ZVCB-648 Bañados de Atlántida, Canelones; ZVCB-687 Puerto Aldao, Soriano; ZVCB-693 Sierra de las Ánimas, Maldonado; ZVCB-707 Río Negro 7 Km aguas arriba del Río Tacuarembó, Tacuarembó; ZVCB-723 Arroyo Pereira, Rincón de Arazatí, San José; ZVCB-761 Arroyo del Perdido 10 Km del Arroyo Grande, San José; ZVCB-873 Carrasco, Montevideo; ZVCB-1087 Estancia Las Flores Pan de Azucar, Maldonado; ZVCB-1118 Mazangano, Cerro Largo; ZVCB-1265 Arazatí, San José; ZVCB-1267 Arazatí, San José; ZVCB-1269/70 Arazatí, San José; ZVCB-1277 Delta del Tigre, San José; ZVCB-1279/80 Delta del Tigre, San José; ZVCB-1287 Playa Pascual, San José; ZVCB-1307 Ruta Interbalnearia, Km 65,5,

Canelones; ZVCB-1377 Sierra de las Ánimas, Maldonado; ZVCB-1386 3Km al NW Estación, Km 329 Ruta a Blanquillo, Rincón de Las Piedras, Durazno; ZVCB-1438 A° Valizas, Rocha; ZVCB-1448 Cerro Verdún, Lavalleja; ZVCB-1528 Río Arapey, 4 Km SW de las Termas, Salto; ZVCB-1638 Pajas Blancas, Montevideo; ZVCB-1777 Charco en el Camino del Indio, Rocha; ZVCB-1829/30 Las Flores, Maldonado; ZVCB-2053 Arroyo de la Mina, 8 Km.. S.E de Aceguá, Cerro Largo; ZVCB-2090 El Espinillar, Salto, Salto; ZVCB-2226 Pque Andresito, La Paloma, Rocha; ZVCB-2397 Arroyo del Cordobés, Durazno; ZVCB-2414 Arroyo de la Mina 8 Km SE de Aceguá, Cerro Largo; ZVCB-2430 Playa Pascual, San José; ZVCB-3341 Fortín San Miguel, Rocha; ZVCB-3437 Estancia Santa Rita a 7 Km. de Ombúes de Lavalle, Soriano; ZVCB-3438 Arroyo de la Mina SE de Aceguá, Cerro Largo; ZVCB-3813 Laguna del Diario, Maldonado; ZVCB-4020 Aguas Dulces, Rocha; ZVCB-5028 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5140 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5246 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5280 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5307 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5312 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5325/26 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5355 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5410 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5431 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5457 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5466 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5472 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5508/09 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5554/56 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5585 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5586/88 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5634 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5636/37 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5641 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5666 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5685 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5702 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-5719 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5742 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5756 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5804/05 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5813 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5823 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5829 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5840/41 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5880 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5881 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5958 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-5996 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6022 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6160 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6176 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6244 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6296 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6381 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6447 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6507 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6524/26 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6629 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6632 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6637/38 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6644 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6658 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6674 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6682/83 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6713 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6715 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6736 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6760 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-6780/82 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-6786/87 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-6827 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6852 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-6866 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-6890 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6905 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-6911 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-6978 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-6983 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-7064/65 Establecimiento El Palenque, Rivera; ZVCB-7103 Establecimiento

El Palenque, Rivera; ZVCB-7157 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-7202/03 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-7214 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-7222 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-7247 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-7287 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-7289 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-7585 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-7730/34 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-7841/42 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-7866 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-7876 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-7882/83 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-7944/44 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-7993 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-8003 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-8080/81 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-8089 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-8120 Establecimiento Velázquez, Rivera; ZVCB-8138 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-8207 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-8296 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-8311 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-8411 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-8451 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-8473/74 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-8494 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-8511 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-8527 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-8546 Establecimiento Velázquez, Rivera; ZVCB-8590/91 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-8594 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-8732 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-8810 Establecimiento Velázquez, Rivera; ZVCB-8851 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-8898 Establecimiento Velázquez, Rivera; ZVCB-8925 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-9029 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-9040 Establecimiento Velázquez, Rivera; ZVCB-9044 Establecimiento Velázquez, Rivera; ZVCB-9058/59 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-9133 Establecimiento Vázquez, Rivera; ZVCB-9347 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-9402 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-9492 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-9556 Establecimiento Trinidad, Rivera; ZVCB-9907/08 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-9916 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-9920/22 Establecimiento Rocha, Rivera; ZVCB-11180/83 Pueblo Madera, Ruta 5 km 492, Rivera; ZVCB-15213 Barra de Valizas, Rocha; ZVCB-17128 Pueblo Madera, Ruta 5 km 492, Rivera; ZVCB-17129 Valizas, Rocha; ZVCB-17130 Ruta 10, Km 248,8, Rocha; ZVCB-17131 Valizas, Rocha; ZVCB-18474 Coronilla, Sede de Karumbé, Rocha; ZVCB-19598 Coronilla, Sede de Karumbé, Rocha.

Apéndice VI: Soluciones de laboratorio

EDTA 0,5 M (pH 8) -1 litro-:

- Mezclar 186 g de EDTA con 800 ml de agua destilada
- Ajustar el pH con NaOH (~20 ml) sólo se termina de disolver cuando se ajusta el pH
- Utilizar agua destilada para llevar a 1 lt
- Autoclavar

EDTA salina:

- 150 ml EDTA 0,5 M
- 150 ml NaCl 0,5 M (PM 58,44 g)
- 200 ml agua destilada

NaCl 0,5 M:

- Para 500 ml
- 14,61 g NaCl
 - agua destilada hasta completar 500 ml
 - Agitar hasta disolver completamente
- La solución se guarda a temperatura ambiente para que no se cristalice

NaCl 5M:

- 292,2 g de NaCl
 - Disolver agitando en 800 ml de agua destilada
 - Llevar a 1 litro con agua destilada
- La solución se guarda a temperatura ambiente para que no se cristalice

SDS 20 % (dodecil sulfato sódico):

- Para 500 ml
- 100 g SDS en polvo
 - llevar a 500 ml con agua destilada
 - Agitar
- La solución se guarda a temperatura ambiente para que no se cristalice

Tris-Cl 1M:

- Para 500 ml pH 8,0
- 60,57 g de Tris
 - Agregar 400 ml de agua destilada
 - Agregar aproximadamente 33 ml de HCl para llevar a pH >7,8
 - Completar con agua destilada

Buffer TE:

- Para 1 lt (Tris Cl 0,01 M; EDTA 0,001 M) :
- 10 ml Tris-Cl 1 M pH 8,0
 - 2 ml EDTA 0,5 M
 - Llevar a 1 litro con agua destilada
- Una vez preparada la solución se autoclava y luego se guarda en la heladera

Purificación de fenol (sólido):

- Para 500 g de fenol
- Fundir a 68 °C y colocar el fenol líquido en un erlenmeyer de 2 lts de capacidad
 - Agregar 0,5 g de 8- hidroxiquinolina
 - Agregar 1 volumen de Tris-Cl 0,5 M pH 8,0 –1^{er} lavado–
 - Agitar con agitador magnético 15 minutos
 - Dejarlo reposar hasta que se separen bien las fases
 - Descartar la fase de arriba (en el 1^{er} lavado las fases no se separan bien)
 - Agregar 1 volumen de Tris-Cl 0,1 M pH 8,0 (2^{do} lavado)
 - Agitar con agitador magnético 15 minutos
 - Dejarlo reposar hasta que se separen bien las fases
 - Descartar la fase de arriba
 - Repetir el 2^{do} lavado hasta llegar al pH deseado (mayor a 7,8)

-Generalmente el lavado se repite 3 veces.

*Si no se llega al pH deseado agregar unas perlas de NaOH en el último lavado

Cloroformo-isoamílico:

-24 partes de cloroformo

-1 parte de alcohol isoamílico

Acetato de sodio 3M:

Para 500 ml:

-123,06 g de acetato de sodio (PM 82,04)

-Agregar agua destilada hasta completar 500 ml

-Agitar con agitador magnetico hasta disolver

Buffer de lisis:

-5 ml de Tris HCl 1M (pH 8)

-10 ml de EDTA 0,5 M (pH 8)

-10 ml de SDS 10 % (o 5 ml al 20 %)

-1 ml de ClNa (5M)

-Mezclar todo y llevar a 100 ml con agua destilada

Proteinasa K (1mg/ml):

-10 mg de proteinasa K (o sea, 0,01 g)

-10 ml de agua estéril

TBE 5X:

-54 g de Tris base

-27,5 g de ácido bórico

-20 ml de 0,5 EDTA (pH 8,0)

-Preparar y agitar con 800 ml de agua destilada

-Completar a 1 lt

*Se guarda en un frasco caramelo en la heladera

Loading 10X:

-250 mg de azul de bromofenol

-33 ml de Tris pH 7,6 (150 mM)

-60 ml de glicerol

-Llevar a 100 ml con agua destilada

*Guardar en heladera o freezer. En geles de agarosa se usa 6X

Gel de agarosa 1 %: (cuba de 12 x15 cm)

-1gr de agarosa en erlenmeyer

-100ml de TBE 0,5 X. Llevar 2 min a microondas o hasta que esté cristalino

-Agregar 1,5 μ l de bromuro de etidio

-Enfriar hasta que se pueda sostener con la mano

-Poner los peines

-Verter en la cuba encintada y dejar enfriar hasta que se puedan sacar fácilmente los peines

-Colocar el gel dentro de la cuba para que no se seque